

*Effekten av to ulike formuleringer av takrolimus på
insulinsekresjon og følsomhet – Prograf[®] og Advagraf[®]*

Kjerstin Havnes



Mastergradsoppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2010

Innhold

Innhold

INNHold	2
1. FORORD.....	5
FORKORTELSER	7
SAMMENDRAG	9
2. INTRODUKSJON/BAKGRUNN.....	11
2.1 NYRETRANSPLANTASJON	11
2.1.1 <i>Faktorer som utgjør risiko for avstøtning og død</i>	12
2.2 MEDIKAMENTELT REGIME	13
2.2.1 <i>Kalcineurin</i>	13
2.3 .KALSINEURINHEMMERE	15
2.3.1 <i>Kinetikk Tacrolimus</i>	16
2.4 GLUKOSEHOMEOSTASEN	18
2.4.1 <i>Insulin/C-peptid</i>	19
2.5 DIABETES MELLITUS	20
2.6 FORMULERINGER	23
2.7 HENSIKT MED STUDIEN.....	24
3. MATERIALE OG METODER.....	26
3.1 PASIENTER	26
3.2 STUDIEDESIGN.....	27

Innhold

3.2.1	Medikamentbruk	28
3.3	HYPERGLYKEMISK GLUKOSE CLAMP	28
3.3.1	Metode	28
3.3.2	Praktisk prosedyre	30
3.3.3	Clampberegninger/likninger	32
3.4	FARMAKOKINETIKK	34
3.4.1	Farmakokinetiske parametre	34
3.5	ANALYSEMETODER	35
3.5.1	Konsentrasjonsbestemmelse av Tacrolimus	35
3.5.2	Konsentrasjonsbestemmelser av Insulin og C-Peptid	35
	C-peptidanalyser	37
3.6	STATISTISK ANALYSE	38
4.	RESULTATER	40
4.1	PASIENTER	40
4.2	HYPERGLYKEMISK CLAMP	43
4.2.1	Sekresjon av insulin og C-peptid	44
4.3	FARMAKOKINETIKK	48
5.	DISKUSJON	49
6.	KILDELISTE	54
	APPENDIX	58
6.1	APPENDIX I STUDIEPROTOKOLL	58
6.2	APPENDIX II	72
	Pasientinformasjon	72

Innhold

6.3	APPENDIX III.....	78
6.4	APPENDIX IV.....	79
6.5	APPENDIX V.....	80
6.6	APPENDIX VI.....	81
6.7	APPENDIX VII	82
6.8	APPENDIX VIII.....	83

1. Forord

Det er mange som fortjener varme tanker og takk for at det har vært mulig for meg å fullføre dette året og denne oppgaven..

Uten pasientene hadde det ikke vært mulig å gjennomføre studien.

Bioingeniør Kirsten Lund stilte med fantastisk presisjon, uten deg hadde ingen venfloner blitt satt. Takk for fantastisk god støtte, praktisk hjelp og ikke minst ditt gode humør på morgenkvisten.

Investigator Karsten Midtvedt har rekruttert pasienter med stort engasjement og effektivitet og har i tillegg vært behjelpelig med å finne relevant litteratur.

Overlege Trond G. Jenssen har gitt verdifulle tilbakemeldinger i forhold til metoden, og stilt opp som administrastor av glukose mang en tidlig morgen.

Takk til bioingenjørene på nyrefysiologisk lab, Jannicke Narverdu, Els Breistein og Jean Stenstrøm, for hyggelige lunsjpauser og god oppfølging av pasienter når det var behov for det.

Takk til Anders Åsberg og Hege Christensen som lot meg få sjansen. Det har vært et lærerikt år.

Gjengen på lesesalen har vært et humørfyllt innslag. Og takk til Robert for uvurderlig hjelp med det tekniske og statistiske når det sto på som verst.

Og til slutt, men egentlig først. Familien min. Mamma som har stilt opp på alt. Ingrid som har karret seg ut av dynene grytidlig for å ta i mot Vilde før barnehagen åpnet og jeg måtte være steder. Bard som har passet Vilde, og hjulpet meg med

Forord

statistikktanker.

Og min kjære bror Olaf som har gått foran som et godt eksempel når livet ikke blir som man har planlagt. Du har rett, her og nå er det som gjelder.

Og vakre, fine, tålmodige, livlige Vilde, du danser deg gjennom dagene med et smil og godt humør, uten deg hadde livet vært kjedelig. Endelig er mamma ferdig på skolen. Nå er det din tur!

Oslo 01.06.2010 Kjerstin Havnes

FORKORTELSER

AE	adverse events
AUC	areal under kurven
BID	to ganger daglig
BMI	kroppsmasseindeks
C_{\max}	maksimal konsentrasjon
C_0	nullkonsentrasjonsmålinger, trough
CsA	ciclosporin A
CYP	cytokrom P450 enzym
DI	disposition indeks
DM	diabetes mellitus
EDTA	etylendiamin tetraeddiksyre
ELISA	Enzym-linked-Immunosorbent Assay
F	biotilgjengelighet
FKBP 12	FK bindende protein
GDR	glukose disposal rate
HCG	hyperglykemisk clamp
HLA	humant leukocyt antigen
HRP	horse radish peroksidase
I	plasmainsulin
IL	interleukin
IMPDH	Inosine monophosphate dehydrogenase

FORKORTELSER

ISI	insulinsensitivitetsindeks
LMB	lean body mass
M	metabolisert glukose
MHC	major histocompatibility kompleks
NFAT	nuclear factor of activated t-cells
OD	optisk tetthet
OUS	Oslo universitetssykehus
pgp	p-glykoprotein
pk	farmakokinetikk
PTDM	post transplantasjons diabetes mellitus
QD	en gang om dagen
RRT	nyreerstatningsprogram.
Secr _{1.phase}	førstefasesekresjon
Secr _{2.phase}	andrefasesekresjon
SD	standardavvik
SPC	preparatomtale
SS	steady state
tac	tacrolimus
TDM	therapeutic drug monitoring
T _{max}	tid ved maksimalkonsentrasjon
TMB	tetramethylbenzidin
Tx	transplantasjon
WHO	verdens helseorganisasjon

SAMMENDRAG

Bakgrunn/introduksjon

En vanlig komplikasjon etter nyretransplantasjon er post transplantasjons diabetes mellitus (PTDM) som er assosiert med redusert graft og pasientoverlevelse. Det immundempende legemiddelet tacrolimus (tac) er involvert i utviklingen av PTDM, sannsynligvis via en påvirkning på de insulinproduserende β -cellene i pankreas, som igjen fører til redusert insulinfrisetting. En ny "slow-release" formulering av tacrolimus, Advagraf, er tilgjengelig på markedet og pasienter skal kunne konvertere fra den tradisjonelle formulering (Prograf) i et 1:1 døgndoseforhold.

Det primære målet for denne studien var å undersøke om det er noen forskjell i andrefase insulinfrisetting for de to formuleringene. Sekundært ble førstefase insulinfrisetting og første og andrefase C-peptidfrisetting målt. I tillegg ble det foretatt farmakokinetiske undersøkelser for om mulig å finne korrelasjon mellom farmakokinetiske parametre og insulinfrisetting.

Metode

I denne oppgaven er 14 pasienter inkludert. Alle gjennomgikk to hyperglykemiske clamper. Første clamp ble foretatt mens pasientene tok Prograf, deretter ble et bytte av formulering foretatt og 4-6 uker etter byttet ble clamp to utført. Farmakokinetiske undersøkelser ble foretatt på clampdagene.

Resultat

Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller i parametre knyttet til insulinfrisetting. Det var stor variasjon mellom individer og intraindividuell. Det ble

SAMMENDRAG

funnet statistisk signifikante endringer i t_{\max} - og C_0 -verdier for de to formuleringene. Advagraf hadde signifikant høyere t_{\max} og lavere C_0 . Det ble sett en tendens til mulig lavere AUC-for Advagraf.

Konklusjon

Det ble funnet statistisk signifikant forskjell i t_{\max} - og C_0 . For insulinfrisettingsparametre ble det ikke sett statistisk signifikante endringer.

2. Introduksjon/bakgrunn

2.1 Nyretransplantasjon

I Norge har det vært utført transplantasjoner (Tx) siden 1950 årene. For nyresyke har transplantasjon vært etablert behandling siden 1969[1]. Oslo universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet, er eneste senter i Norge som utfører transplantasjoner.

Donasjonsraten i Norge har vært stabil de siste årene med 65 -70 avdøde organgivere pr. år[2]. I tillegg er det ca 40 % levende givere som donerer nyre i Norge. Ved utgangen av 2008 var det 192 pasienter (40.3 per million) på aktiv venteliste for nyre fra avdød donor.

I 2009 ble det utført 292 nyretransplantasjoner ved rikshospitalet, og insidens for nyreerstatningsbehandling (RRT; dialyse og Tx) var 559 [3]. Det har vært en økende insidensrate i nyreerstatningsbehandling siden 1980. Pasientene kommer fra alle aldersgrupper og har forskjellige årsaker til nyresykdom, hovedårsakene er glomerulonefritt, diabetisk nefropati og hypertensjon[4].

Ved en allogen transplantasjon (mellom genetisk forskjellige individer) vil det alltid være en risiko for immunreaksjon som kan føre til tap av graft hos mottaker.

Immunsystemet vil, dersom det ikke hemmes, kjenne igjen alloantigener på graftet.

MHC-molekyler, hos mennesker også kalt *human leukocyt antigen molekyler* (HLA),

er de antigenene som utløser de kraftigste immunreaksjoner. Før en allogen

transplantasjon kan gjennomføres utføres det derfor forlikelighetstester på blodtype (AB0) og HLA. Økt grad av forlikelighet øker sannsynligheten for graftoverlevelse.

Etter transplantasjonen er det nødvendig med livslang profylaktisk immunosuppressiv behandling for å hindre immunologiske reaksjoner. Man skiller mellom hyperakutte (etter minutter til timer), akutte (utvikles over 5-7 dager) og kroniske

avstøtningsreaksjoner, disse har ulike mekanismer til grunn [5]. Sammensetningen av den immunosuppressive behandlingen bestemmes av ulike pasientfaktorer som alder, fysisk status (på recipient/donor) og vevsforlikelighet. Sentralt i den immunosuppressive behandlingen er kalsineurinhemmere i tillegg til Prednisolon og mykofenolat. Pasientene behandles i tillegg for eventuelle andre komplikasjoner, som f.eks. høyt blodtrykk.[6]

2.1.1 Faktorer som utgjør risiko for avstøtning og død

I løpet av 2008 døde 330 (7,8 %) av det totale antall pasienter i RRT i Norge. Av disse døde 81 stk (1,9 %) med et fungerende graft mens 6 personer døde innen to måneder etter tap av graft. Disse dødsfallene defineres som tx-relaterte. Vanligste dødsårsaker var kardiologiske komplikasjoner(26 %) og infeksjoner (26 %), fulgt av maligne tumorer (14%)[2]. En norsk registerstudie fra Rikshospitalet 1990-2005 viste at for pasienter over 70 år var tid i dialyse før transplantasjon, alder på donor samt akutte rejeksjonsepisoder innen tre måneder etter transplantasjon prediktorer for død [7]. Vevsforlikelighet er en viktig faktor for graftoverlevelse. I tillegg er det flere andre aspekter som spiller inn som alder, tid i dialyse, tidlige rejeksjoner, graftfunksjon, medikamentell behandling (nefrotoksiske legemidler/for lav throughkonsentrasjon) og diabetes. I tillegg er noncompliance negativt assosiert med graftoverlevelse.

Compliance

Compliance forstås som etterlevelse, og er en beskrivelse av hvordan legens ordinasjoner følges, spesielt om legemidler tas som forskrevet[8]. En review utført av Jin et al [9] identifiserte mange faktorer som påvirker compliance, disse kan bl.a. klassifiseres som pasientrelaterte, terapirelaterte, sykdomsrelaterte, og økonomisk relaterte. Behandlingsregimets kompleksitet er en viktig faktor. Antall medikamenter

var ikke avgjørende, men complianceraten går ned med økning i antall daglige doseringer [9]. Compliance er vist å assosieres direkte med dosefrekvens[10]. Non-compliance er vanlig hos nyretransplanterte og assosieres med økt antall sene, akutte reaksjonsepisoder som igjen er en risikofaktor for dårligere graftoverlevelse [11-14]. En review fra 2004 bekrefter disse funn, men problematiserer imidlertid forskning rundt dette grunnet manglende standardiserte metoder for måling[13].

2.2 Medikamentelt regime

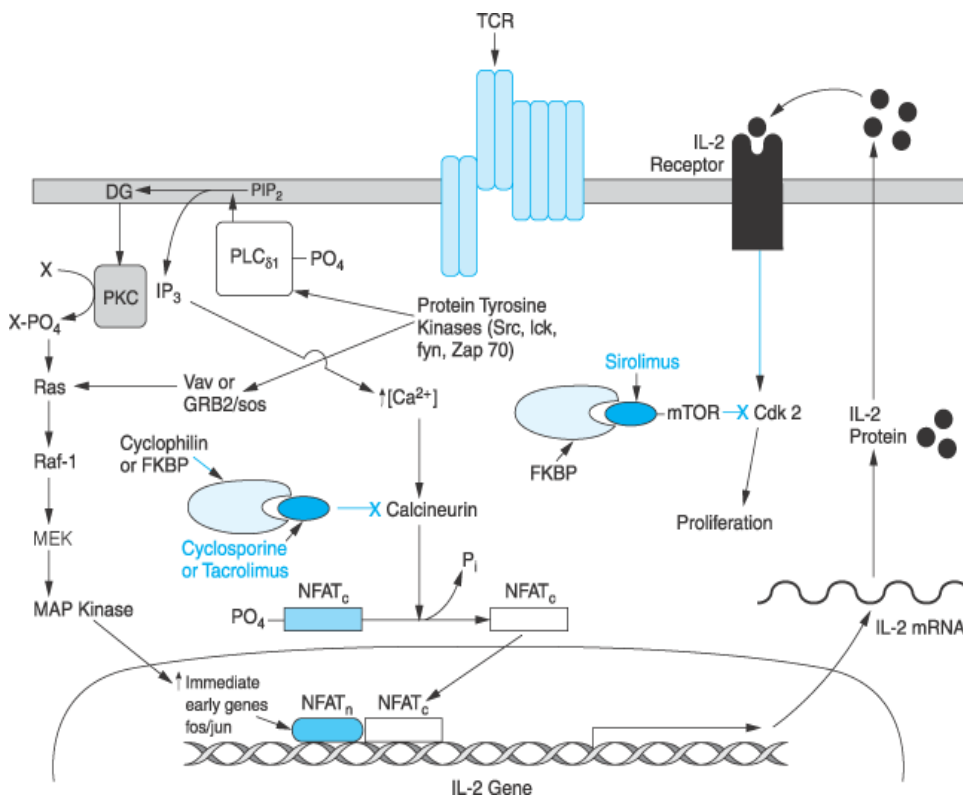
Standard induksjons og vedlikeholds immunosuppressiv behandling ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet er en *kvadrupel protokoll*, innført fra 01.01.07. Den består av fire medikamenter: IL2-R- antistoff, som gis på selve transplantasjonstidspunktet og dag 4 etter transplantasjon, en kalsineurininhibitor, tacrolimus (tac) eller ciclosporin (CsA), kortikosteroider og IMPDH-inhibitor(Mykofenolat). Type kalsineurininhibitor avhenger av faktorer som alder og metabolsk status. Pasienter <50 år , mørkhudete og type 1 diabetikere får tac. Startdose er 0,04 mg/kg, og troughmål for dag 0-180 er 3-7 µg/L, etter dag 180 reduseres dette til 3-5 µg/L. Kortikosteroider gis fra dag 0 i høy dose og reduseres gradvis ned mot 5 mg/døgn, og kan for noen pasienter seponeres etter hvert. Pasienter som vurderes til å ha økt grad av klinisk risiko for reaksjon får tilpasset sitt behandlingsregime utenom standard protokoll avhengig av risikonivå og immunologisk utredning før transplantasjon[6].

2.2.1 Kalcineurin

Kalcineurin er en cytosolisk calmodulinavhengig fosfatase som katalyserer fosforyleringen som skal til for at nuclear factor of activated t-cells (NFAT) kan entre

Introduksjon/bakgrunn

nukleus. Kalsineurin og NFAT er uttrykt i mange vev inkludert insulinutskillende celler [15] og integrerer Ca^{2+} signaler som koordinerer genekspressjon, vekst, differensiering og cellulær respons til miljøpåvirkning. I T-hjelpeceller er calcinevrin en del av kaskaden som resulterer i produksjon av cytokiner. Intracellulær Ca^{2+} aktiverer kalsineurin, som igjen aktiverer Nuklear Factor of Activated T-cells(NFAT). Kalsineurin/NFAT medierer T-celleaktivering gjennom transkripsjons-aktivering av bl a IL-2 (se **Fig. 2.1**). IL-2 er en T-cellevekstfaktor og stimulerer til proliferasjon og differensiering av T-celler i tillegg til proliferasjon og sekresjon av aktiverte B-celler [16-18]. Kalsineurin er et ratebestemmende enzym[16].

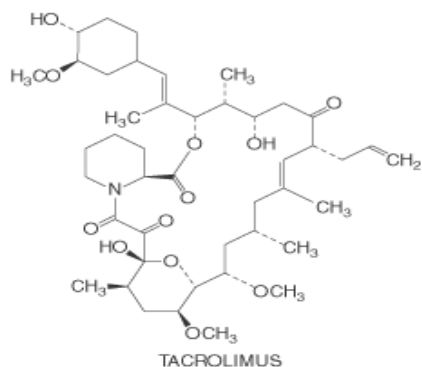


Figur 2.1 Defosforylering av NFAT katalyseres av kalsineurin. NFAT er påkrevet for å indusere en mengde cytokine gener, inkludert IL-2. Il-2 er prototypen på en t-celle vekst- og differensieringsfaktor

2.3 .Kalsineurinhemmere

Tacrolimus (tac) og ciclosporin (CsA) er begge effektive immunosuppressive substanser. De har ulik struktur, og danner komplekser med ulike proteiner, men de hemmer begge kalsineurin (**se fig.1.1**)[17]. Tacrolimus er en svært potent immunosuppressant av makrolidtypen, som virker på intracellulære signalveier indusert som resultat av T-cellereseptoraktivering. Tacrolimus binder seg til immunofilinet FK-Binding Protein 12(FKBP 12) i cytosol med en påfølgende interaksjon med kalsineurin [18, 19]. Et kompleks av tacrolimus, FKBP, Ca^{2+} , calmodulin og kalsineurin dannes og inhiberer kalsineurinfofataseaktivitet. Dermed hindres NFAT fra å entre nukleus og transkripsjon av blandt annet IL-2, finner ikke sted[18, 20]. Dermed hindres IL-2 avhengig proliferasjon av T-celler.

Tacrolimus



Figur 1.2 Tacrolimus, $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{NO}_{12} \cdot \text{H}_2\text{O}$ [11] produsert av *Streptomyces tsukubaensis* [17]

2.3.1 Kinetikk Tacrolimus

Absorpsjon

Tac absorberes i hele mage/tarmkanalen, og da spesielt i duodenum og jejunum, hos mennesker. Vanligvis absorberes tilgjengelig tac hurtig med en t_{\max} mellom 1-3 timer. Gjennomsnitts biotilgjengelighet etter peroral administrering er ca 25 % (variasjon 6-43% hos voksne) [11, 21].

En reviewartikkel av Staatz et al [22] oppsummerer bl.a. biotilgjengeligheten (F) hos nyretransplanterte fra 6 kinetikkstudier, og gjennomsnittlig F varierte fra 11-24 %. Faktorer som påvirker biotilgjengeligheten er bl. a matinntak og sammensetning av kost (fettrik mat senker opptak mest). 1.pasmetabolisme ved gastrointestinal cytochrom P450 (CYP) 3A isoenzymer og PGP efflux er utstrakt og forklarer lav og variabel biotilgjengelighet[22]. I tillegg vil langvarig diare kunne påvirke biotilgjengelighet, sannsynligvis pga påvirkning av PGP og CYP i tarm[23].

Distribusjon

Tac utøver en høy grad av proteinbinding, >98,8%, hovedsakelig til serumalbumin og orosomukoid [21]. Tac bindes i stor utstrekning til erytrocytter. Fullblodskonsentrasjon er mange ganger høyere enn korresponderende plasmaverdier, opp mot en 20:1 distribusjonsratio [21, 22, 24]. Vevsdistribusjonen er ekstensiv, distribusjonsvolumet ved «steady state» er ca. 1300 liter basert på plasmakonsentrasjonen, 47,6 liter basert på fullblodkonsentrasjonen[21].

Metabolisme

Tacrolimus metaboliseres av Cytochrom P450 CYP 3A enzymer (CYP3A) i tarmvegg (intestinal mucosa) og lever [25, 26]. CYP 3A enzymer er den største komponent av CYP enzymer i lever og tynntarm og er involvert i metabolismen av en stor andel av

Introduksjon/bakgrunn

legemidler. Det er stor individvariasjon i hepatisk ekspresjon av disse. Legemidler som er hemmere eller indukere av CYP 3A4 enzymesystemet vil kunne øke eller senke serumkonsentrasjoner av tac[27].

Eliminasjon

Biliær ekskresjon og faecal eliminasjon av tac står for 95 % av clearance [26].

Tacrolimus har lang og variabel halveringstid, med et gjennomsnitt på 43 timer hos friske. Norsk SPC oppgir en halveringstid for nyretransplanterte på 15,6 timer [21]. Vicari-Christensen et al opererer imidlertid med gjennomsnittlig halveringstid for nyretransplanterte på 8,7 timer[26].

Therapeutic drug monitoring (TDM)

Grunnet stor variabilitet i tacrolimus farmakokinetikk og et smalt terapeutisk vindu er TDM av tac nødvendig for å finne optimal balanse mellom effekt og bivirkninger for å opprettholde et funksjonelt allograft. AUC er generelt vurdert som den beste markør for legemiddeleksponering, men er både upraktisk og dyrt. Flere mulige enkelttidspunkt etter inntak er vurdert i forhold til korrelasjon med AUC. De fleste transplantasjonssentre bruker C_0 -målinger (trough) for å monitorere tac. C_0 - er utsatt for store intra og interindividuelle variasjoner, og påvirkes av mange faktorer[25]. Mål for trough-konsentrasjone har blitt redusert de siste årene og ligger på Oslo universitetssykehus nå på 3-5 µg/L når det har gått mer enn 180 dager etter transplantasjon [6].

Bivirkningsprofil

Det er mange og ulike bivirkninger rapportert ved bruk av tacrolimus. Nefrotoksisitet kan være begrensende for bruk, men også vanskelig å skille fra andre årsaker til nyresvikt hos nyretransplanterte. Nevrotoksisitet (gjennom bl. a. skjelvninger,

hodepine, søvnløshet) sees og hypertensjon er vanlig. Glukose-homeostasen påvirkes og utvikling av diabetes er en kjent og alvorlig bivirkning [11, 21, 24, 26].

2.4 Glukosehomeostasen

β -celler i de Langerhanske øyer i pankreas produserer og frisetter hormonet insulin som er nødvendig for systemisk kontroll og opprettholdelse av blodsukker-homeostasen. Insulinsekresjon og produksjon er en nøye regulert prosess der reguleringen er en kombinasjon av bl.a. næringsstoffer, hormoner og nevrotransmittere.

Peptidet insulin syntetiseres som en enkeltkjedet prekursor, preproinsulin. Denne klippes til proinsulin. Den gjenværende ”connector”, C-peptidet, fjernes via proteolyse. Omdannelsen til insulin er tilnærmet fullstendig ved sekresjon. Tilnærmet ekvimolare mengder av insulin og C-peptid skilles dermed ut i sirkulasjonen. Kinetikken er imidlertid forskjellig. Insulinets halveringstid er 5-6 minutter. Degradering av insulin foregår primært i lever, nyre og muskel. Ca 50 % av utskilt insulin som når leveren via portvenen destrueres og når ikke systemisk sirkulasjon. Dette er ikke tilfellet for C-peptid, som har en halveringstid på ca 30 minutter og også finnes i høyere molar konsentrasjon i plasma fordi hepatisk clearance er lavere. C-peptid tjener som surrogatmål for akutt insulinsekresjon[28]. Toft et al [29] postulerer at økt turnover av fettsyrer i lever reduserer insulin-clearance. Opphopning av ikke esterifiserte fettsyrer som kan ses ved overvekt kan påvirke insulin clearance, og dermed C-peptid:insulin ratio. Legemidler eller andre faktorer som altererer hepatisk insulinsekresjon vil påvirke c-peptid:insulin ratioen. Denne ratioen er heller ikke konstant, men endres over tid og påvirkes av sekresjonsrate [30].

2.4.1 Insulin/C-peptid

Glukose er hovedstimuliet for insulinsekresjon i mennesket. Glukose entrer β -cellene via fasilitert transport. En fosforylering finner sted og starter en kaskade som fører til depolarisering og spenningsstyrte Ca^{2+} åpnes. Influx av Ca^{2+} fører til vesikulær insulinsekresjon fra sekretoriske granula i β -cellene. Glukose er imidlertid mer effektivt for insulinfrisetting når inntatt oralt enn intravenøst. Fordøyelse av bl a glukose stimulerer vagal aktivitet og fører til utskillelse av gastrointestinale hormoner som stimulerer insulinfrisetting. Insulin fremkaller en rekke biologiske responser. Lever, muskler og fett er de viktigste målvev når det gjelder regulering av glukosehomeostasen. Insulin kontrollerer cellulært opptak og utnyttelse av næringsstoffer, fremmer anabole prosesser og inhiberer katabole[28]. En alterering av β -cellefunksjon vil forstyrre glukosehomeostasen.

Kalcineurinhemmere nedsetter insulinsekresjon, men virkningsmekanismen er ikke klarlagt. Sannsynligvis utøver kalsineurinhemmerne en negativ effekt på β -cellene i Pankreas[17, 18]. Tac har i en in vitro-studie vist en reversibel tids- og doseavhengig nedsettelse av insulinsekresjon i en glukoseresponsiv, insulinutskillende celledinje. I den samme studien ble det også påvist en negativ effekt på gentranskripsjon[31]. I et ”islet perfusion system” med humane øyceller ble glukosestimulert insulinsekresjon redusert med om lag 50 % ved høydose tacrolimuspåvirkning. Første-fase insulinsekresjon ble i tillegg kraftig kupert. Lave doser tac viste ikke en signifikant reduksjon[32]. Det er imidlertid usikkert om det er en direkte påvirkning av *sekresjon* som er årsaken. Studier har vist at Kalcineurin/NFAT signalveien sannsynligvis er involvert i Ca^{2+} aktiveringen av insulintranskripsjon i β -celler[33, 34]. Det er foreslått at en tidsavhengig reduksjon av insulintranskripsjon/syntese fører til nedsatt intracellulært innhold/lager av insulin, noe som til slutt vil lede til nedsatt

insulinsekresjon[34]. Nedsatt β -celleproliferasjon og cellemasse resulterer i diabetes både i dyremodeller og mennesker [33, 34]. Morfologiske endringer er observert i biopsier av transplanterte pankreasallograft hos tac-brukere. Disse pasientene sto imidlertid på høye doser tac (12-20 ng/ml) i tillegg til høyere doser kortikosteroider (10-25 mg/dag)[35]. Tac-reduksjon bedret betacellefunksjon i en studie [36] og van Hoff et al [37] viste at reduksjon av tac med 30% innenfor det terapeutiske vindu økte sekresjon av insulin og C-peptid. Det antas at tacrolimuseffekt på insulinsekresjon er doseavhengig og reversibel[37].

Insulinfrisetting/ insulinsensitivitet kan måles ved bruk av forskjellige metoder, der *Glukose Clamp* er den mest nøyaktige, men også mest ressurskrevende [38, 39].

Ulike parametre i insulin/glukosehomeostasen kontrolleres (clampes) til de nivåer som er ønskelige ved hjelp av intravenøs administrasjon. DeFronzo og medarbeidere har beskrevet prinsippene for metoden, utført på friske frivillige[39].

2.5 Diabetes Mellitus

Forstyrrelser/avvik i β -cellefunksjon med nedsatt eller fullstendig manglende β -cellemasse og insulinproduksjon ligger til grunn for alle former for diabetes og ses ofte i kombinasjon med nedsatt insulinfølsomhet. Dette resulterer i hyperglykemi og andre metabolske forstyrrelser. Sykdommen er kronisk og kan gi mange og alvorlige langtidskomplikasjoner[34, 40]. En komplikasjon er nefropati, som kan gi nyresvikt. Diabetikere er også utsatt for å få kardio-, perifere- og cerebrovaskulære komplikasjoner som igjen affiserer nyrefunksjon [2].

Introduksjon/bakgrunn

Det er vanlig å dele sykdommen inn i grupper, og WHO har foreslått fire hovedgrupper:

Type1 diabetes mellitus: kan debutere i alle aldre og skyldes manglende insulinproduksjon. Ødelagte betaceller og total mangel på insulin. Den kliniske debut er ofte akutt.

Type2 diabetes mellitus. Kan også debutere i alle aldre. Skyldes insulinresistens og utilstrekkelig insulinproduksjon.

Andre typer diabetes mellitus som genetiske defekter i β -cellefunksjonen og insulinvirkningen, sykdommer i pankreas, endokrinopatier, effekter av legemidler o.a.

Svangerskapsdiabetes.

Diabetes diagnostiseres ved hjelp av målinger av plasmaglukose etter WHO's kriterier [41].

Post transplantasjons diabetes mellitus (PTDM) er diabetes mellitus oppstått etter transplantasjon. Immunsuppressiv behandling er hovedårsak til utvikling av PTDM, det er derfor naturlig å plassere denne i WHO-gruppe 3: ”medikamentutløst diabetes mellitus”. Etiologien likner på Diabetes type 2, med insulinresistens og insulinmangel involvert i patogenesen. Klassifisering og definisjon av PTDM er imidlertid gjenstand for debatt. Egne kriterier for diagnostisering av PTDM er ikke fastsatt. Pga risiko for utvikling av mikrovaskulære komplikasjoner er det ikke hensiktsmessig å tolerere forhøyede glukoseverdier for transplanterte. PTDM bør derfor diagnostiseres etter samme krav som WHO's internasjonalt aksepterte kriterier for diabetes [42, 43]. PTDM behandles i Norge etter samme kriterier som for diabetes type 2 [44].

Studier av insidens, risikofaktorer og etiologi av PTDM benytter seg av ulike diagnostiske kriterier. Montori et al publiserte i 2002 en reviewartikkel som

presenterte 19 studier med 3611 pasienter. 12 av studiene omhandlet nyretransplanterte, og estimerer for hyppighet av PTDM i denne gruppen varierte fra 2-50%, og forklares bl. a med variasjoner i diagnostiske kriterier [45]. Valderhaug et al[46] sammenliknet to kohortstudier som omhandler utvikling av PTDM med ca 10 års mellomrom fra 1996-97 til 2004-05. På disse 10 år beskrives nærmest en halvering av risiko for å utvikle PTDM på tross av at faktorer som alder og BMI var signifikant høyere i studien med lavest forekomst av PTDM. Mulige forklaringer er bl.a at pasientene har endret immunosuppressivt regime, gjennomgår færre rejeksjoner og benytter lavere steroiddoser.

Risikofaktorer

Det er velkjent at kalsineurinhemmere er en risikofaktor for utvikling av PTDM [47]. I tillegg er behandling med glukokortikoider assosiert med økt risiko for diabetes mellitus(DM) [48]. Glukokortikoider nedsetter insulinsensitiviteten. Boots et al konkluderte med at å seponere dosering prednisolon fra 10 mg/dag bedret insulinfølsomheten[36]. Midtvedt et al fant indikasjoner på at å redusere dose av prednisolon helt ned mot 5 mg/døgn bedret insulinfølsomheten, og økt glukosesensitivitet er assosiert med langtidsbedring av glukosetoleranse. Ytterligere dosereduksjon mot 0 viste ingen sikker ekstra effekt[49]. Høy alder og BMI er også risikofaktorer[50] i tillegg til status organdonor og familiehistorie med DM [45]. Det vil være ønskelig med tidlig diagnostisering for å unngå for høyt blodsukker over tid, ingenting tyder på at transplanterte tåler høyt blodsukker bedre enn andre[42, 43]. Insulinresistens er en tidlig markør for risiko for å utvikle diabetes type 2. I tillegg er det indikasjoner på at den akutte insulinsekresjon spiller en kritisk rolle i opprettholdelsen av glukosehomeostasen. Det kan være sammenheng mellom lav førstefase insulinsekresjon og risiko for å utvikle Diabetes[51]. Hjelmesæth et al[47] har ved hjelp av oral glukosetoleransetest funnet en sammenheng mellom nedsatt glukosetoleranse og insulinsensitivitet/insulinsekresjon. Det ble også observert at for personer med nedsatt glukosetoleranse var første og andrefase insulinsekresjon

nedsatt, og Insulin AUC lavere. I den samme studien økte PTDM-pasienter som bedret sin glukosetoleranse de nevnte parametre signifikant.

Konsekvenser av PTDM

PTDM er assosiert med redusert graft og pasient overlevelse. I tillegg økes morbiditet og mortalitet som følge av kardiovaskulære lidelser[49, 50, 52].

2.6 Formuleringer

En langsom frisettingsformulering av tacrolimus, Advagraf, er introdusert på det europeiske markedet. Advagraf muliggjør dosering en gang om dagen som erstatning for den tradisjonelle formuleringen, Prograf, doseringsregime, med administrering to ganger daglig. Konvertering mellom formuleringene skal gjennomføres med en 1:1 døgndoseratio, og bør gjøres under kontroll av lege og med monitorering av blodkonsentrasjoner [24]. Det skal være mulig å bruke samme TDM-strategi, inkludert samme trough-konsentrasjonsmål for den nye formuleringen[24]. De to formuleringene har ulik farmakokinetisk profil. C_{max} , og t_{max} for de to formuleringene er ulik og gjenspeiler forskjell i frisettingsprofil [21, 24].

Bioekvivalensstudier med crossover-design er gjort på voksne, stabile nyre-og levertransplanterte med samme mg for mg daglig doseratio av tac [53, 54]. Henholdsvis 67 og 62 pasienter fullførte de to studiene. SS (steady state) eksponering og "target trough-level range" for Advagraf var ekvivalente i forhold til Prograf. I disse studiene konkluderes det med at en konvertering fra Prograf til Advagraf i 1:1 døgndoseringsratio kan utføres hos stabile lever og nyretransplanterte uavhengig av bl.a. rase, kjønn og tilstedeværelse av diabetes. Crespo et. al [55] utførte i 2009 en retrospektiv analyse på nyretransplanterte fra transplantasjon og 180 dager fremover i tid. 2 grupper, 26 nyretransplanterte på Advagraf og 26 på Prograf. Konklusjonen var at Advagraf-gruppen hadde behov for høyere dosering (i mg/kg kroppsmasse) enn

Prografgruppen, men forskjellene synes å utjevnes over tid. Insidens av PTDM var lik i begge gruppene, med 3 nye tilfeller i hver av gruppene, men kriteriene brukt i diagnostiseringen av PTDM er ikke definert[55].

I en randomisert fase II studie gjennomført av Wlodarczyk et. al[56], ble farmakokinetiske (pk) parametre sammenliknet hos nytransplanterte for de to formuleringene i en komparativ studie. Målet var å sammenlikne pk-parametrene i oppstartsfasen samt i steady state. AUC_{0-24} , C_{max} , t_{max} , og C_{24} , var endepunkter for studien. For Advagraf gruppen var C_{max} lavere enn for Prografgruppen, og t_{max} var lengre. Dette reflekterer den forsinkede frisettingsprofil for Advagraf, Det var sterk korrelasjon mellom AUC_{0-24} og C_{min} for begge formuleringene ($r=0,83$ for Advagraf og $r= 0,94$ for Prograf). Dette brukes som vurderingsgrunnlag for TDM-strategier for Advagraf (se punkt om TDM). Med unntak av uke 1 var gjennomsnittlig dosering av tac ”prolonged release” høyere, men ikke signifikant, enn den for tac BID. I oppstartsfasen lå pasienter på Advagraf lavere i trough-konsentrasjon, noe som rettet seg til dag 4, denne forskjellen hadde ikke noen signifikans for overlevelse, men studien fulgte pasientene i kun 6 uker [56]. I en oppsummeringsartikkel utført av First, konkluderes det med at for de novotransplanterte har både BID formuleringen og QD formuleringen lavere forekomst av hyperglykemi/diabetes enn tidligere rapportert, men det kommer ikke klart frem om det er forskjell mellom de to formuleringene [57]. Studiene referert til som er utført på Advagraf så langt har ikke vist signifikante forskjeller i insidens av, alvorlighetsgrad eller type adverse events (AE). Studiene har imidlertid ikke vært designet for å se på denne typen problemstillinger.

2.7 Hensikt med studien

Hensikten med studien er å undersøke om to ulike formuleringer av tacrolimus, Prograf og Advagraf, har forskjellig effekt på glukoseomsetning hos

Introduksjon/bakgrunn

nyretransplanterte uten diabetes. Forskjeller i farmakokinetisk profil mellom de to formuleringene kan teoretisk påvirke betacellenes funksjon ulikt. Advagrafs effekt på glukosemetabolisme er så vidt bekjent ikke studert med formålstjenlige metoder.

Primære markører som undersøkes er første- og andrefase insulin og c-peptidsekresjon.

Primært endepunkt:

Å sammenlikne insulinsekresjon ($\text{secr}_{2,\text{phase}}$) mellom de to formuleringene av tacrolimus.

Sekundære endepunkter:

Å sammenlikne effekten av de to formuleringene på $\text{secr}_{1,\text{phase}}$, insulinsensitivitet og å undersøke mulig assosiasjon med individuell systemisk eksponering av tac ved hjelp av målte verdier for C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$ eller t_{24} og troughkonsentrasjoner.

3. Materiale og metoder

3.1 Pasienter

20 voksne nyretransplanterte pasienter ble rekruttert til studien. 14 er inkludert i denne oppgaven. Pasientene måtte være under behandling med tacrolimus, enten som en slow release ”en gang om dagen” formulering, Advagraf® eller ”to ganger om dagen”, Prograf®. Pasientene måtte være i en stabil posttransplantasjonsfase, dvs. plasmakreatinin under 150 µmol/L, ingen rejeksjonsepisoder eller endring i tac-dosering siste 2 uker før inklusjon og en prednisolondose på 5 mg/dag eller mindre. Pasientene ble rekruttert fra stor-Oslo området, og all deltakelse i studien har vært på OUS, Rikshospitalet. Pasientene har ellers fulgt vanlige posttransplantasjonsprosedyrer. Studien var godkjent av regional etisk komite. Pasientene mottok skriftlig og muntlig informasjon om studien. Informert skriftlig samtykke til deltagelse ble innhentet i henhold til Helsinkideklarasjonen og ICH-GCP retningslinjer. Pasientene mottok kopi av samtykkeerklæringen. Pasientene mottok ikke økonomisk kompensasjon for deltagelse, men kunne få utgifter i forbindelse med prøvedagene refundert. Løpende utgifter har blitt dekket av interne driftsmidler ved nyreseksjonen, OUS, Rikshospitalet, og Farmasøytisk Institutt, universitetet i Oslo.

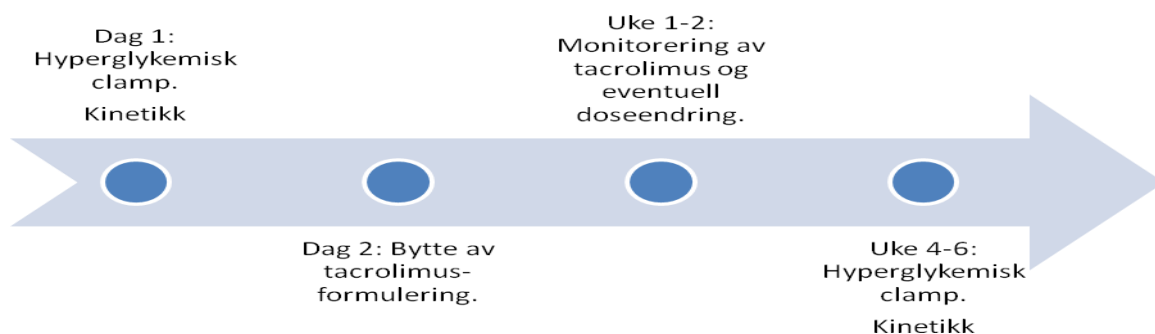
Eksklusjonskriterier:

- Akutte rejeksjonsepisoder innen 2 siste uker før inklusjon
- Endring i Tac-dosering innen 2 siste uker før inklusjon
- Diabetes Mellitus (WHO-kriterier)
- Gravide eller ammende mødre, eller kvinner i fertil alder som ikke benytter seg av en tilfredsstillende prevensjonsstrategi.
- Samtidig behandling med: diltiazem, verapamil, fenytoin. Karbamazepin, flukonazol, ketokonazol, vorikonazol, erythromycin, klarithromycin.
- Pasienter behandlet med utprøvningsmedisiner.

3.2 Studiedesign

Studien var en ikke randomisert, ikke blindet, cross-overstudie. Pasientene møtte til prosedyre i to runder med 4- 6 ukers mellomrom (se figur 3.1). De gjennomgikk alle en tretimers hyperglykemisk clamp under behandling med sin standard tac-formulering som for de 14 pasientene inkludert i masteroppgaven var Prograf.

Deretter byttet pasientene formulering, og den hyperglykemiske clamp ble gjentatt 4-6 uker etter byttet. Clampen ble utført umiddelbart etter administrasjon av morgendose med tac. Pasientene møtte fastende fra kl 24 kvelden før, det vil si uten mat/drikke/røyk/tyggegummi, og hadde ikke tatt morgenmedisiner. Før oppstart ble tac administrert ($t=0$), resten av medisinene tok pasientene etter prosedyren. Det ble tatt prøver for å måle fullblodskonsentrasjon etter et gitt oppsett (se punkt 3.4), for alle pasientene i minst 4 timer. Det var ikke obligatorisk med full 24-timerskinetikk. Byttet til alternativ tac-formulering ble utført i en 1:1 daglig doseratio, og ble deretter monitorert og justert etter behov i overenstemmelse med Oslo universitetssykehus, Rikshospitalets protokoll for troughkonsentrasjoner. Pasientene har møtt opp 2 ganger til through-konsentrasjonsmåling av tac for evnt å få justert dose til passende nivå mellom de 2 studiedagene. Pasientene fulgte ellers standard posttransplantasjonsprosedyrer ved sitt lokale sykehus gjennom hele studieperioden.



Figur 3-1 Oversikt over tidsintervall i studien.

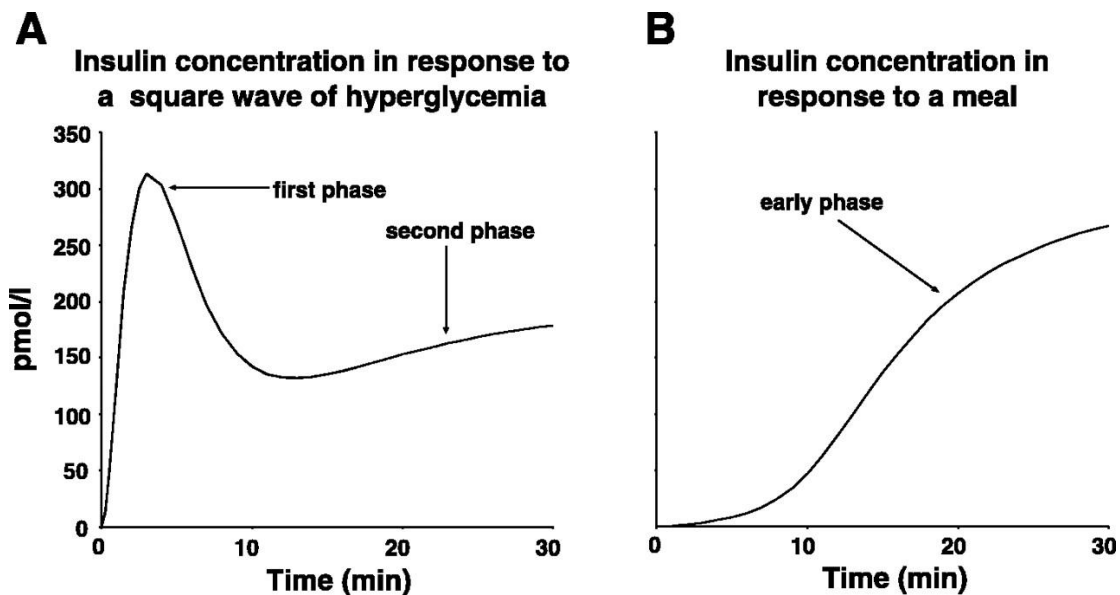
3.2.1 Medikamentbruk

Alle pasientene hadde en tacrolimusbasert immunosuppressiv behandling. Dosering var basert på individuelle konsentrasjonsmålinger i fullblod i henhold til protokoll for rikshospitalet. Etter bytte av formulering ble alle pasientene kontrollert for å se om fullblodskonsentrasjon lå innenfor terapeutisk vindu. Pasientene tok immunosuppressive legemidler i henhold til protokoll og mottok behandling for andre symptomer/bivirkninger, men kunne ikke ta medisiner som er indukere eller hemmere av CYP3A. All annen behandling var konstant gjennom hele studien.

3.3 Hyperglykemisk glukose clamp

3.3.1 Metode

Pasientenes insulinsekresjon ble målt ved hjelp av en hyperglykemisk glukose clamp (HGC), som er en gullstandardmetode for å måle insulinsekresjon[38]. Blodglukosekonsentrasjonen fikseres(”clampes”) ved hjelp av intravenøs glukose til ønsket nivå. Glukose/insulin feedbacksløyfen brytes [39]. Insulinfrisettingen som ses etter intravenøs administrering av glukose er bifasisk. En rask førstefase, der lagret insulin blir frigitt fra β -cellene. Denne fasen varer i 5-10 minutter, med en Cmax etter 3-5 minutter. Andre fase er gradvis, varer lengre og gjenspeiler β -cellenes evne til kontinuerlig produksjon og utskillelse av insulin[38, 39, 58, 59]. En tydelig førstefase sekresjon ses kun ved en hurtig endring i glukosestimuli på β -cellene i pankreas slik tilfellet er ved intravenøs administrasjon av sukker[58]. (Se figur 3.2.)



Figur 3-2 Forskjell i plasmainsulinrespons(inkrementell) etter intravenøs administrasjon av sukker(A) og et måltid (B). (A) viser en bifasisk profil, med tydelig første og andrefasesekresjon. Dette mønsteret ses ikke etter et måltid. Insulinrespons etter matinntak [58].

Når plasmaglukosekonsentrasjonen er i steady-state, forutsatt at endogen glukoseproduksjon er supprimert, vil mengde infundert glukose være lik mengde glukose som translokaliseres fra glukose-”space”, altså metabolisert glukose (M). M er et mål på glukosetoleranse [39]. Mitrakou et al sammenliknet M ved henholdsvis hyper- og euglykemisk clamp og fant en korrelasjon på 0.7. Euglykemisk clamp er gullstandard for måling av insulinfølsomhet [38]

Plasmainsulinresponsen (I) til hyperglykemi er målet på β -cellenes respons til glukose. Dette gir en detaljert fremstilling av β -cellenes sekresjon som respons til den fikserte konsentrasjon. For friske frivillige er en kontinuerlig, økende glukoseinfusjonsrate nødvendig for å opprettholde en fiksert glukosekonsentrasjon i løpet av den tiden prosedyren varer [39]. HGC slik den er beskrevet av DeFronzo et al baserer seg på målinger i arterieblod[39]. Det ble derfor anvendt varmемansjett for å dilatere og dermed arterialisere vener i arm der blodprøver ble tatt[38].

Pasientene fikk en bolusdose med glukose, 150 mg/kg, for å heve blodsukkernivået til ønsket verdi på 10 mmol/L. Deretter ble en variabel glukoseinfusjon startet for å

Materiale og metoder

holde blodsukkernivået stabilt på 10 mmol/L gjennom hele prosedyren. Starthastighet beregnes ut fra vekt, deretter justeres infusjonsraten etter plasmaglukosemålinger hvert 5 min. Prinsipper for et enkelt feedbacksystem ble anvendt.

Førstefase og andrefase insulin og C-peptidsekresjon ble estimert ved å beregne arealet under kurven (AUC) trapesmetoden for de første 10 minuttene ($\text{Secr}_{1,\text{phase}}$) og deretter den siste timen av clampen ($\text{Secr}_{2,\text{phase}}$) (formel 3.3 og 3.4). Det ble i tillegg korrigert for variasjoner i plasmaglukose ved å dividere $\text{AUC}_{120-180}$ med gjennomsnittlig plasmaglukose for samme tidsintervall. Beregninger knyttet til insulinsensitivitet ble også gjennomført. Glukose disposal rate (GDR, formel 3.6) ble beregnet ut i fra infundert glukose siste time av clamp (M) dividert på lean body mass (LBM). Lean Body Mass er kroppsmassen minus kroppsfett og beregnes etter Humes formel[60] (formel 3.5). Insulinsensitivitetsindeks (ISI) kalkuleres som GDR dividert med gjennomsnittlig seruminsulin for samme perioden (formel 3.7) Glukoseclearance beregnes ved å dividere ISI med gjennomsnittlig serumglukose de siste 60 minuttene av clampen. Og disposition indeks (DI) beregnes ved å multiplisere AUC med ISI og sier noe om betacellenes funksjon. (formel 3.8)

3.3.2 Praktisk prosedyre

Pasientene møtte fastende fra senest kl 24 kvelden før og var sengeliggende under hele clamp-prosedyren. Venekateter (BD VenflonTM Pro, 1,3x12 mm, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Sweden) ble lagt inn i begge armer. Treveiskran (BD ConnectaTM Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Sweden) ble tilkoblet. Høyre arm ble pakket inn i en termostatregulert varmemansjett (Thermal Vascular Dilator, type 3900 KA, 24, 100W, Swetron AB, Veddesta, Sweden. Thermal control unit: Kanthal, Sweden) innstilt til 52 grader. I venstre

Materiale og metoder

venekateter ble glukose og evt NaCl-løsning infundert, fra høyre venekateter ble blodprøver tatt.

Prøver til måling av insulin og C-peptid ble tatt ved -15 minutter og umiddelbart før glukosebolus ble satt (5,0 ml SSTTM-rør, BD vacutainer[®]). Ved samme tidspunkt ble også plasmaglukose målt (Hemocue TM Glukose 201+, Hemocue AS, Ängelholm, Sweden). Bolusdose glukose (Glukos 200mg/ml, Fresenius Kabi, Norge) ble administrert (av lege?), over to minutter (50 ml BD sprøyte pluss evt 20 ml BD, sprøyte). Deretter ble det injisert 20 ml fysiologisk saltvann (Natriumklorid 9mg/ml) for å unngå tromboflebitt i åren. Glukoseinfusjonen (Glukos 200mg/ml, Fresenius Kabi, Norge) ble startet umiddelbart etter, dvs 2,5 minutter etter start av bolus. Til infusjonen ble IVAC[®] 590-series volumetrisk pumpe (Cardinal Health, Switzerland) og Alaris [®] Products infusjonssett uten filter (San Diego, California) benyttet.

Blodprøver til måling av Insulin og C-peptid ble i tillegg tatt 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 og deretter hvert 20 min til 180 minutter etter **glukoseinfusjonens** start. Gjennom hele prosedyren måles plasmaglukose hvert 5 min (Hemocue TM Glukose 201+, Hemocue AS, Ängelholm, Sweden, måleapparat og kyvetter) og infusjonsraten ble justert etter disse verdiene. For å forhindre koagulasjon ble kateteret etter hver prøvetaking injisert/skyllet med ca 1 ml fysiologisk saltvann (Natriumklorid 9mg/ml)

Etter at prosedyren var utført fikk pasienten et måltid og drikke.

Blodprøvene til konsentrasjonsmåling av insulin og C-peptid ble etter prosedyren sentrifugert (2500 rpm) i 10 minutter. Serum ble pipetert over i to 1,8 ml nunc Cryorør og frosset ned ved -20 °C til analyser ble foretatt.

3.3.3 Clampberegninger/likninger

Formel 3.1: Bolusdose:

$$(\text{Kroppsvekt (kg)} \times 150 \text{ mg/kg}) / \text{styrke glukoseløsning} = \text{_____ ml}$$

Formel 3.2: Start infusjonshastighet:

$$(0,3 \times \text{kroppsvekt}) \times 3 = \text{_____ ml/time}$$

Felles for insulin og C-peptid:

Første fase sekresjon ($\text{Secr}_{1,\text{phase}}$): beregnet som *areal under serumkonsentrasjon vs tid kurve* (AUC-trapesregelen) for de første 10 minuttene av HGC. Konsentrasjoner ved tidspunktene: 0, 2.5, 5, 7.5, 10 minutter ble anvendt.

Andre fase sekresjon ($\text{Secr}_{2,\text{phase}}$): beregnet som AUC siste time av HGC. Konsentrasjoner ved tidspunktene: 120, 140, 160, 180 minutter ble anvendt.

Formel 3.3: $\text{Secr}_{1,\text{phase}}$:

Korrigerer for basalkonsentrasjonsnivå

$$\text{AUC}_{0-10} = ((C_0 + C_{2,5})/2) \times 2,5 + ((C_{2,5} + C_5)/2) \times 2,5 + ((C_5 + C_{7,5})/2) \times 2,5 + ((C_{7,5} + C_{10})/2) \times 2,5 - (C_0 \times 10) = \text{_____ pmol L}^{-1}\text{min}$$

Formel 3.4: $\text{Secr}_{2,\text{phase}}$:

$$\text{AUC}_{120-180} = ((C_{120} + C_{140})/2) \times 20 + ((C_{140} + C_{160})/2) \times 20 + \dots +$$

Materiale og metoder

$$((C_{160}+C_{180})/2) \times 20 - (C_0 \times 60) = \text{_____ pmol L}^{-1} \text{ min}$$

Formel 3.5: Lean Body Mass:

Estimeres ved hjelp av Humes formler[60].

$$\textbf{Kvinner: } L.B.M. = 0,29569 \times \text{vekt(kg)} + 0,41813 \times \text{høyde(cm)} - 43,2933$$

$$\textbf{Menn: } L.B.M. = 0,32810 \times \text{vekt(kg)} + 0,33929 \times \text{høyde(cm)} - 29,5336$$

Formel 3.6: Glukose disposal rate (GDR)

$$GDR = \frac{\text{ml glukose inf. siste time} * \text{glukosekons (}\mu\text{mol/ml)}}{LBM * \text{tiden i minutter (60 min)}} = \text{_____ } \mu\text{mol/kg*min}$$

Formel 3.7: Insulinsensitivitets Indeks (ISI)

$$ISI = \frac{GDR}{\text{gjennomsnittskons. av insulin siste time (pmol/L)}} = \text{_____ } \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1} / \text{pmol L}^{-1}$$

Formel 3.8: Disposition Indeks

$$GDI = AUC_{\text{Insulin 120-180}} \times ISI$$

Før statistiske analyser av AUC (første og andrefase), ISI og disposition indeks ble ratio beregnet etter forholdet Advagrafverdier:Proagrafverdier.

3.4 Farmakokinetikk

Konsentrasjon-tid kinetikkprofiler ble undersøkt samtidig med clampene. Pasientene byttet formulering av tacrolimus etter første kinetikkprofil. Full kinetikkprofil var ikke obligatorisk. Hver profil består derfor av forskjellig antall blodprøver og tidspunkter for prøvetaking, alle fullførte imidlertid 4 timer (se tabell 4.1)

Tidspunkter skissert i protokoll:

For Prograf:

Nullprøve ble tatt umiddelbart før inntak Prograf og deretter 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 15, 23, 24 timer etter inntak.

For Advagraf:

Nullprøve ble tatt umiddelbart før administrering av Advagraf og deretter 0,25, 0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 23, 24 timer etter inntak.

3 ml EDTA-rør (for en pasient 4ml EDTA-rør) ble anvendt ved hvert tidspunkt til måling av tac-konsentrasjon i fullblod. Disse ble frosset ved -20 °C.

3.4.1 Farmakokinetiske parametre

Målte/observerte verdier: T_{\max} , C_{\max} , C_{\min} .

3.5 Analysemetoder

3.5.1 Konsentrasjonsbestemmelse av Tacrolimus

Analysene ble utført ved Klinisk kjemisk avdeling på Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Metoden brukt er Architect Tacrolimus Assay, basert på måleprinsippet Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) Metoden er beskrevet og evaluert av Wallemacq et. al[61].

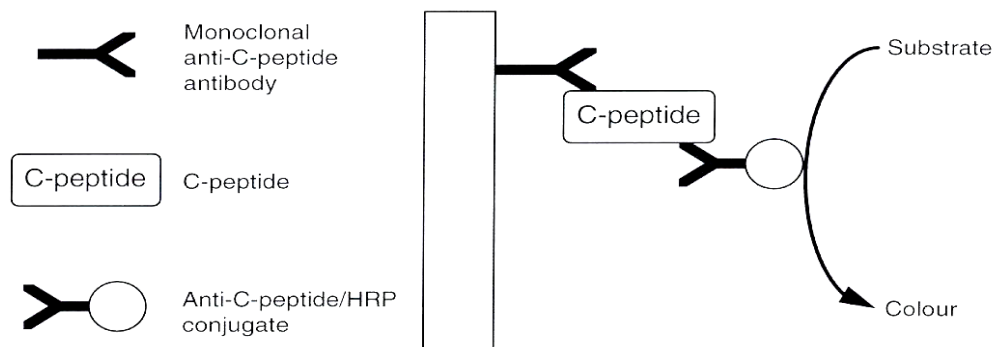
Prøvene ble tint fra -20 °C før assay. 200 µL EDTA-blod ble vortex-mikset med 200 µL precipiteringsreagens som inneholdt metanol og sinksulfat. Precipitatet sentrifugeres for å fjerne uløselig protein. Den klare supernatant ble deretter analysert på Architect i2000SR (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) i henhold til produsentspesifikasjoner. Instrumentet kombinerer ekstrahert blodprøve med paramagnetiske mikropartikler coatet med anti-tacrolimus antistoff fra mus etterfulgt tilsetning av tacrolimus- acridiniumtracer. (sporstoff..) (preteritum eller presens?) Deretter ble partiklene inkubert og vasket. Chemiluminescence ble målt og tacrolimuskonsentrasjon kalkulert utifra kalibreringsinformasjon lagret i instrumentet. Duplikat av tacrolimuskalibratorer ved konsentrasjoner 0, 3, 6, 12, 20 og 30 ng/mL ble analysert for å etablere kalibrering av assayen.

3.5.2 Konsentrasjonsbestemmelser av Insulin og C-Peptid

Konsentrasjon av disse ble bestemt ved bruk av solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) Ulik kit for hver substans. (Human Insulin ELISA kit, Invitrogen, Camarillo, California, USA for Insulin. C-Peptid ELISA kit, Dako Denmark, Glostrup, Denmark for C-peptid).

Prinsipp ELISA:

ELISA assays brukt i denne studien benytter seg av to monoklonale antistoffer direkte rettet mot spesifikke epitoper på substans det skal analyseres for. Simultan inkubering av prøver og enzymmerket monoklonalt antistoff i mikroplatebrønn ”coated” med substansspesifikt antistoff fører til dannelse av et kompleks . Vasking fjerner ubundet HRP-merket antistoff, deretter tilsettes substratet. Dette gir et fargeomslag (figur 3-3). Etter inkubasjon stanses reaksjonen ved å tilsette en syre. Platen avleses spektrofotometrisk, optisk tetthet (OD) måles. Fargeintensitet er direkte proporsjonal med konsentrasjon [62, 63].



Figur 3-3 Viser prinsippene for ELISA med C-peptid som eksempel. Tatt fra instruksjonsmanualen til kit'et.

Insulin

Validering:

I produsentenes spesifikasjon er gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for intra og interassaypresisjon oppgitt til å være henholdsvis 5,4 % og 8,6 %. Gjennomsnittlig recovery er 93,1 %. Deteksjonsgrense var 0,17 μ IU/ml.

Analyse:

Prøver med gitt konsentrasjon til standardrekke fulgte med i kit fra leverandør, samt to kontroller. Alle prøver ble utført med to paralleller. Prøver tatt på samme tidspunkt de 2 ulike clampdagene ble analysert på samme brett.

For forsøk som ble utført samtidig ble samme standardrekke anvendt.

Alle standard og kontrolløsninger ble preparert. Insulin ble tint til romtemperatur før applisering. 50 µL standard/kontroll/prøve ble applisert brønnvis etter oppsett, og deretter ble 50 µL anti-insulin HRP (Horse Radish Peroksidase) tilsatt i hver brønn.. Dette ble inkubert på platerister i 30 minutter i romtemperatur, skjermet fra lys, for deretter å bli vasket manuelt tre ganger. 100 µL stabilisert kromogen tetramethylbenzidineløsning (TMB) – H₂O₂ ble tilsatt og plate ble på nytt inkubert, denne gang i 15 min med risting under skjerming fra lys. 100 µL stoppløsning ble tilsatt for å stanse reaksjonen, og optisk tetthet (OD) ble avlest ved 450 nm i plateleseren (Wallac VIKTOR3TM, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland).

Beregninger

Ukjente prøver og kontroller ble avlest fra standardkurve , OD vs konsentrasjon (direkte proporsjonalt forhold), beregnet ved lineær regresjon av målte OD verdier for standardrekken. Insulinkonsentrasjoner ble beregnet i Microsoft Office Excel 2007 ut i fra standarder analysert parallelt.

C-peptidanalyser

Validering

I produsentenes spesifikasjon er gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for intra og interassaypresisjon oppgitt til å være henholdsvis 3,3 % og 3,1 %. Gjennomsnittlig recovery er 98,2 %. Deteksjonsgrense: 0,09 ng/mL (30 pmol/mL)

Analyse

Prøver med gitt konsentrasjon til standardrekke, kalibratorer, fulgte med i kit fra leverandør. Alle prøver ble utført med to paralleller. Prøver tatt på samme tidspunkt de 2 ulike clampdagene ble analysert på samme brett. Det ble analysert to brett samtidig hver runde, en standardrekke på det ene brettet ble anvendt for å beregne konsentrasjon for begge. Alle løsninger ble preparert. C-peptid ble tint til romtemperatur. 25 µL kalibratorer/prøver ble applisert brønnvis på mikrotiterplatene etter oppsett, deretter ble 100 µL konjugat, anti-C-peptid HRP tilsatt. Første inkubasjon i platerister, var på 60 minutter. Brønnene ble deretter vasket manuelt, 3 ganger, før 100 µL TMB (substrat) ble tilsatt. Ny inkubasjon fant deretter sted før stoppløsning, svovelsyre, ble tilsatt. Platene ble deretter avlest ved 450 nm i plateleser (Wallac VIKTOR3TM, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland).

Beregninger

Standardkurve ble beregnet ut i fra kalibratorene med kjente verdier ved hjelp av lineær regresjon. Beregningene av C-peptid-konsentrasjoner ble utført i Microsoft Office Excel 2007 ut i fra standarder analysert parallelt (som for insulin)

3.6 Statistisk analyse

Antall pasienter inkludert i hovedstudien var basert på en antakelse om at en 15 % relativ endring i insulinfrisetting vil være klinisk signifikant. Med et standard avvik på 25 % er 20 pasienter nødvendig for å sikre 80 % teststyrke og et 5 % signifikansnivå. I masteroppgaven er data fra 14 pasienter med.

Alle statistiske analyser ble utført med SPSSTM- 16.0 programvare for Windows.

Verdier oppgis som gjennomsnitt \pm Standard avvik (SD) dersom ikke annet er presisert. For parametrene i oppgaven, med unntak av analyse av t_{\max} - og C_0 -verdier og korrelasjonsanalyser har ratioen Advagraf:Prograf mellom verdier for de to

Materiale og metoder

prøvedagene blitt beregnet før statistisk analyse har blitt foretatt. Normalitet har deretter blitt testet. Student one-sample t-test ble anvendt for alle data med unntak av: t_{\max} verdier som pga manglende normalfordeling selv etter forsøk på normalisering ble analysert med Wilcoxon Signed Rank test for matched pairs, og C_0 -data som ble analysert ved hjelp av parret t-test. $AUC_{C\text{-peptid } 120-180}$ og $AUC_{\text{Insulin } 120-180}$ ble log-transformert for å oppnå normalitet før analyse ble foretatt. Pearsons product-moment korrelasjonsanalyse ble utført på sammenhengen mellom $AUC_{\text{Insulin } 120-180}$ og korresponderende C_0 verdier for tacrolimus for henholdsvis Prograf og Advagraf. P-verdier lavere enn 0,05 anses som statistisk signifikante.

4. Resultater

4.1 Pasienter

14 pasienter ble inkludert og alle fullførte studien. Alle pasientene gikk på Prograf ved studiens start og byttet til Advagraf i løpet av studien. For de 14 pasientene var det ingen som trengte å justerte tac-dosen mellom de to clamp-dagene. En pasient (nummer 6) reduserte imidlertid dosen fra 3 mg/dag til 2 mg per dag, pga en misforståelse.

Hyperglykemisk glukose clamp

For tre av pasientene ble Advagraf-clamp avsluttet før 180 min pga tett venflon og vanskeligheter med å få lagt inn ny. For pasient 1 varte insulininfusjon til $t=170$, men insulinprøver ble ikke tatt ved tid 160 og 180. Denne pasienten hadde et stabilt forløp begge clamper med plasmaglukose rundt 10 og liten endring i infusjonshastighet. For å kunne anvende resultater for denne pasienten i de statistiske analysene ble $t=80-140$ brukt for begge dager. For pasient 5 ble Advagraf clamp avsluttet ved $t=160$, siste insulinprøve ble tatt $t=170$. Denne pasienten hadde også et stabilt forløp. GDR og gjennomsnitt plasmaglukose ble beregnet ut ifra verdier siste 40 minutter av Advagrafclampen. For $AUC_{120-180}$ ble prøve tatt ved $t=170$ ekstrapolert til $t=180$ for å kunne beregne $AUC_{120-180}$ og påfølgende ratio $AUC_{120-180}$ Advagraf:Prograf. For pasient 13 ble clamp avsluttet ved $t=178$. Denne pasienten hadde også et stabilt forløp. GDR ble beregnet ut i fra 58 minutter ($t=120-178$), gjennomsnitt blodglukose og insulin ble beregnet etter planen, men prøver tatt ved $t=178$ ble satt som $t=180$. For pasient 6 er det ikke korrigert for utilsiktet doseendring mellom clampene.

Resultater

Pasient 12 kom i Advagrafclamp ned mot 7mmol/L siste time. Infusjonshastigheten var da på 350 ml/time og ble ikke satt høyere før det kunne verifiseres av lege at det var forsvarlig. Det ble i tillegg sannsynligvis gjort en feil ved analyse av insulinkonsentrasjon for pasient 12 slik at disse må reanalyseres. Disse analysesvarene er derfor ekskludert og er ikke med i de statistiske analysene som er beregnet på verdier basert på insulinkonsentrasjonsmålinger. Pasienten er inkludert i statistiske analyser av C-peptid data. Pasient

Farmakokinetikk

Det var stor variasjon i hvor mange prøver som ble tatt av hver enkelt pasient. (se tabell 4.1) Datamengden var for begrenset til at det var mulig å gjøre en enkel nonkompartment $AUC_{\text{Tacrolimus } 0-24}$ -beregning. Alle fullførte de 4 første timene.

<i>Tidsintervall for prøver til farmakokinetiske undersøkelser</i>		
Pasientnummer	Prograf	Advagraf
1	0-12,5 +23/24	0-10 + 23/24
2	0-6	0-6
3	0-12,5	0-10 +23/24
4	0-4	0-4
5	0-6,5 + 24	0-6
6	0-10 + 23/24	0-12 + 23/24
7	0-11	0-12 + 23/24
8	0-8 + 23	0-8 +23
9	0-6 +24/25	0-6
10	0-10,75 + 23/24	0-8 + 25
11	0-8 + 23/24	0-10
12	0-8 + 23/24	0-7 +24
13	0-4 + 23	0-4 + 23
14	0-8 + 23/24	0-6 + 23/24

Tabell 4.1 Tabellen viser tidsintervall/tidspunkt i timer. Pasient 6 har endret dosering mellom Prograf og Advagraf.

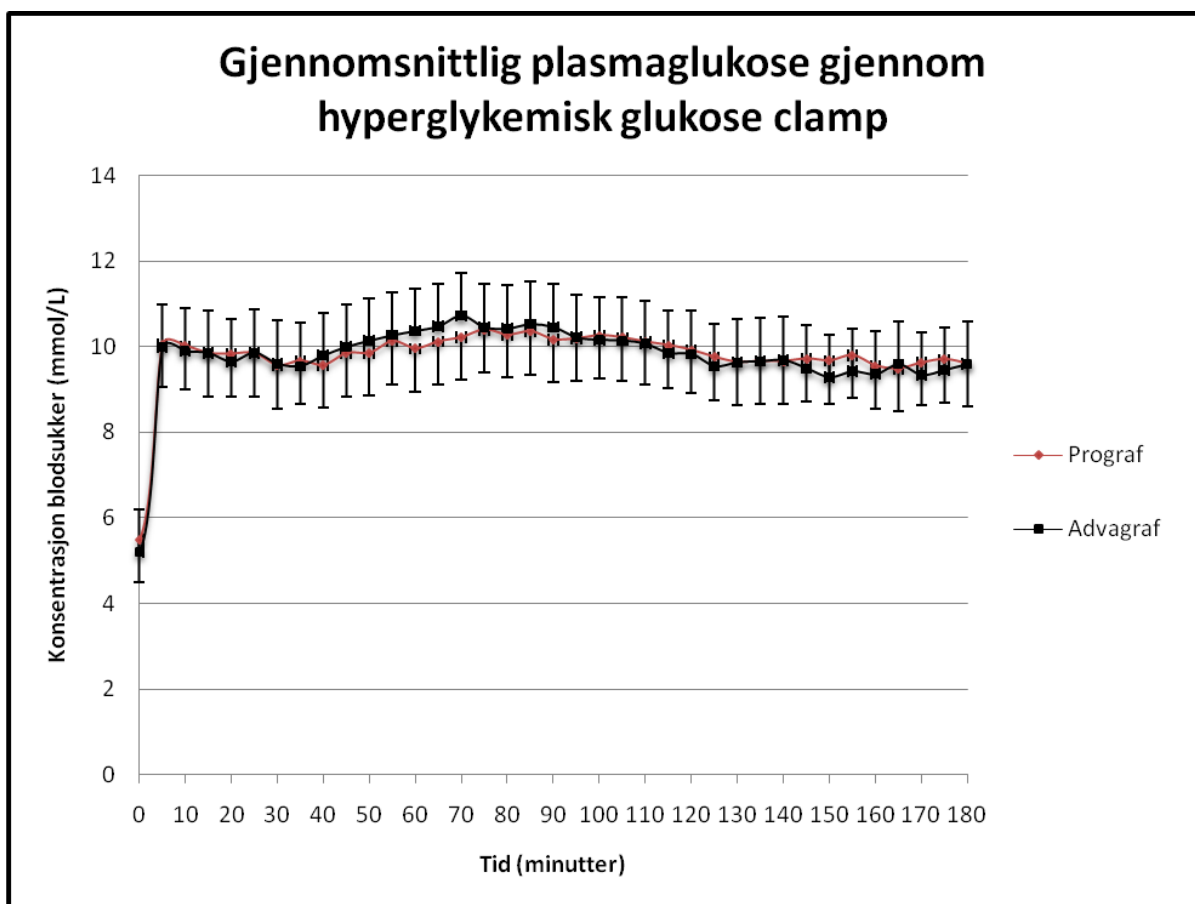
Resultater

For alle pasientene med unntak av en, var antall målinger som ble tatt tilsynelatende tilstrekkelig til å finne C_{\max} og t_{\max} . For pasient 4 var siste prøve for Advagraf tatt ved $t=4$ timer den som hadde høyeste konsentrasjon, det er derfor mulig at konsentrasjonen fortsatte å stige utover dette. I analysene er denne prøven satt som C_{\max} og korresponderende tid som t_{\max} . Se tabell 4.1 for den enkelte pasients prøveintervall.

Det ble ved analysetidspunkt oppdaget at det i de fleste prøvene var en del koagler.

4.2 Hyperglykemisk clamp

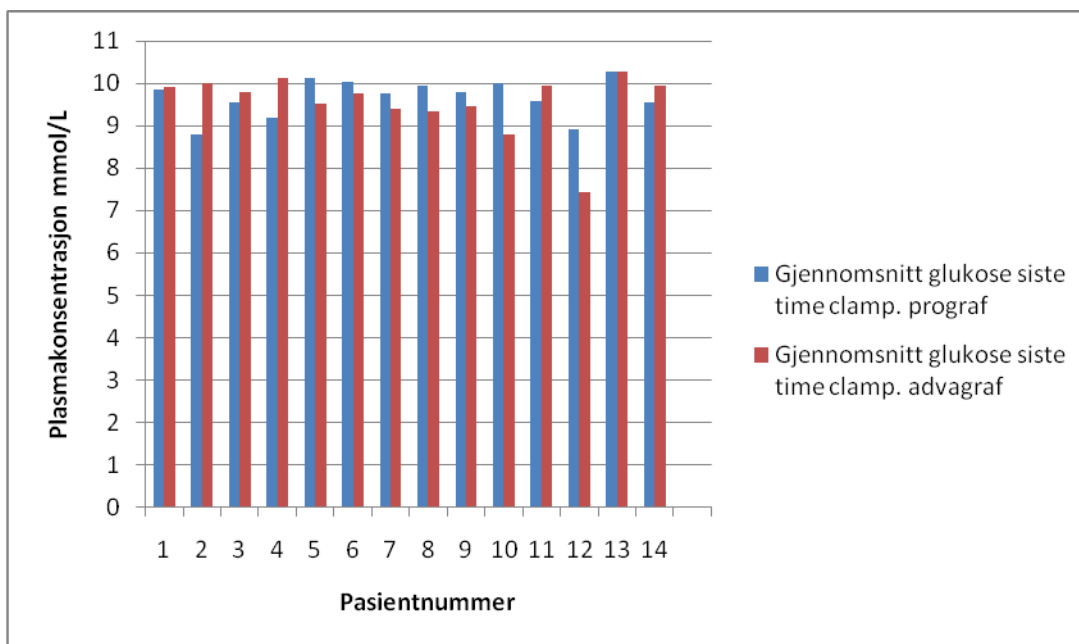
Metoden baserer seg på at blodsukkeret skal holdes konstant på 10 mmol/L gjennom hele undersøkelsen. Når prosedyren ble utført viste det seg i noen tilfeller problematisk å opprettholde plasmakonsentrasjon rundt 10 gjennom hele clampen. Dette gjorde seg gjeldende begge dager. Oversikt over gjennomsnittlig plasmaglukose for alle pasienter viser at gjennomsnittet hadde samme tendens begge dager (figur 4.1). Gjennomsnittlig blodsukker Prograf-clamp var på $9,89 \pm 0,04$ mmol/L og for Advagraf-clamp lå det på $9,90 \pm 0,39$ mmol/L.



Figur 4-1: fremstilling av gjennomsnittlig blodsukker for 2 clamper, Prograf og Advagraf, ved hvert prøvetidspunkt med standardavvik. Standardavvik er markert ensidig, minus for Prograf og pluss for Advagraf.

Resultater

Insulinsensitivitet og andrefase insulinsekresjon beregnes ut i fra siste time av clampen (t=120-180) (individuelle verdier i appendix IV), det er den perioden det er mest essensielt å opprettholde blodglukose på 10 mmol/L. Der var gjennomsnitt $9,67 \pm 0,11$ mmol/L (Prograf) og $9,53 \pm 0,16$ mmol/L (Advagraf) (se figur 4.2 for individuelle forhold).



4-2 Pasientvis gjennomsnitt plasmaglukose siste time av clamp. For pasient 1 er det t= 80-140 for begge dager som fremstilles.

De største intraindividuelle variasjonene var hos pasient 2, 10 og 12.

4.2.1 Sekresjon av insulin og C-peptid

Andrefase insulinsekresjon

Det primære mål for oppgaven var å måle andrefase insulinsekresjon.

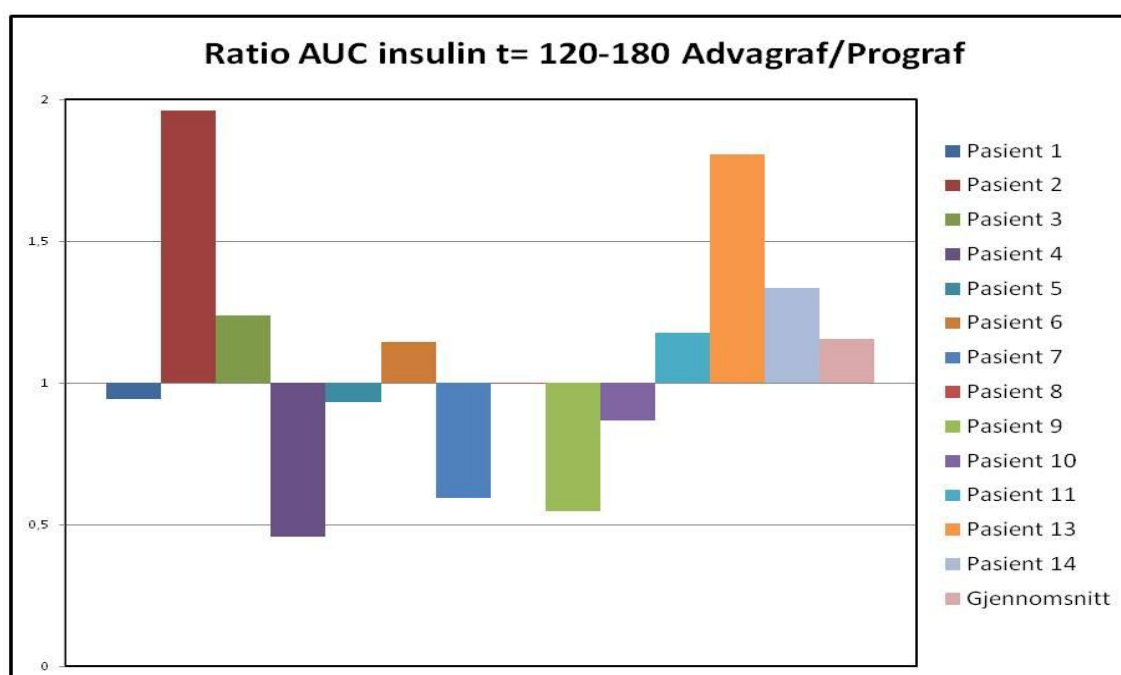
AUC insulin T=120-180

For insulin var data fra 13 pasienter som ble inkludert i analysene. Pasient 12 er ikke inkludert på grunn av nødvendig reanalysering av insulindata.. Ratio ble beregnet som

Resultater

$AUC_{Advagraf\ 120-180}$ dividert med $AUC_{Prograf\ 120-180}$. For individuelle verdier se figur 4.3 og appendix V.

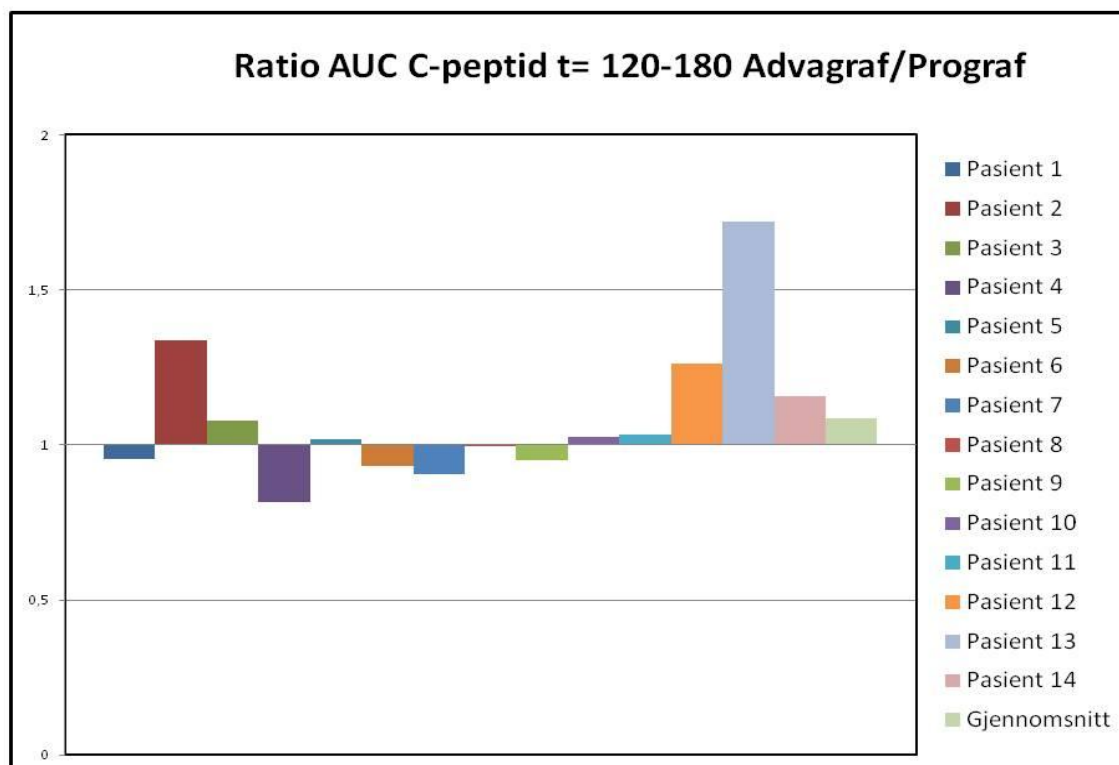
Gjennomsnittlig ratio var på $1,08 \pm 0,45$ ($p=0,546$). Det var imidlertid stor variasjon i forandringene mellom pasientene (se figur 4.3).



Figur 4-3 Fremstilling av pasientvise ratioer for Insulin AUC $t=120-180$. Verdier fra Advagrafclamp dividert med verdier fra prografclamp.

AUC C-peptid $t=120-180$.

For analysene av C-peptid var data fra 14 pasienter inkludert. Ratio ble beregnet som $AUC_{Advagraf\ 120-180}$ dividert med $AUC_{Prograf\ 120-180}$. For individuelle verdier se figur 4.4 og appendix VI. Gjennomsnitt var $1,065 \pm 1,21$, ($p=0,228$).



Figur 4-4 Fremstilling av pasientvise ratioer for C-peptid AUC t=120-180. Verdier fra Advagrafclamp dividert med verdier fra Prografclamp.

Tendensene er like for insulin og c-peptid.

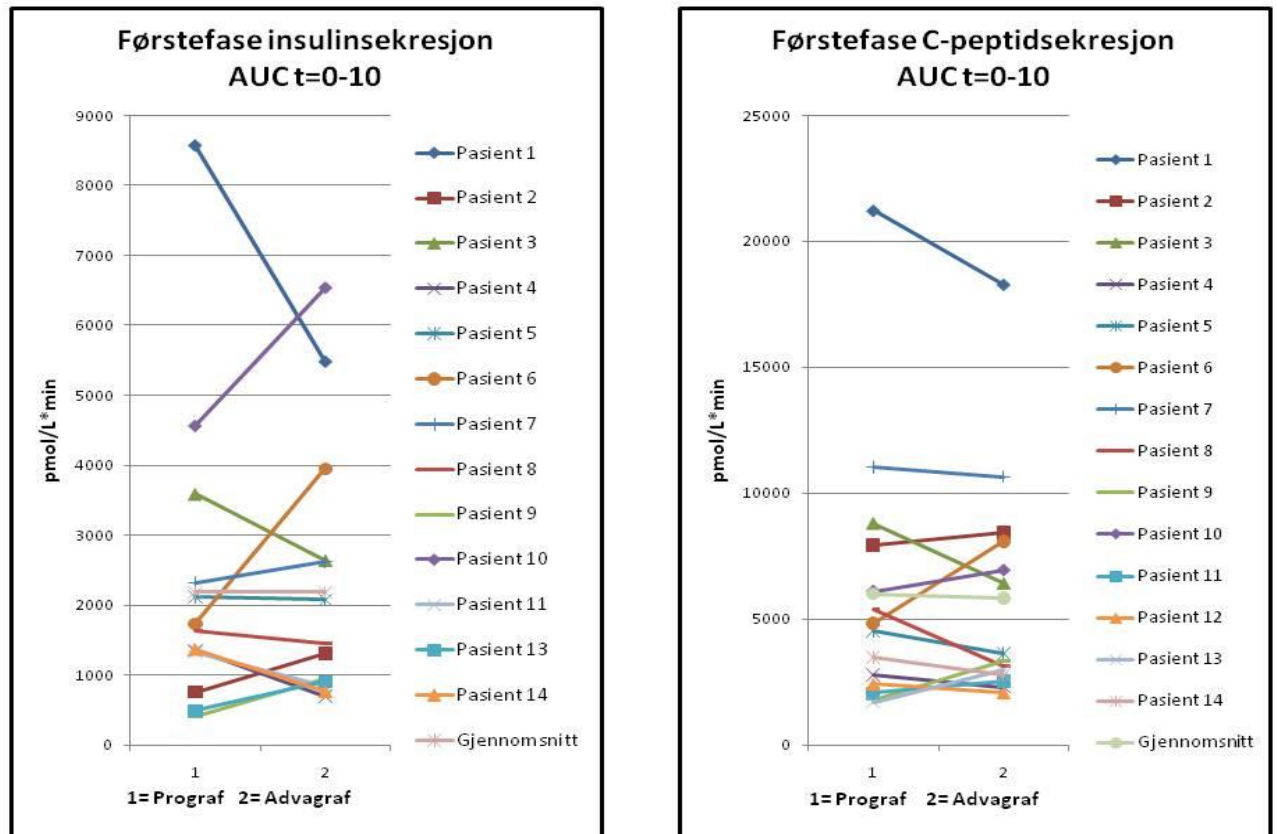
Førstefase sekresjon.

Insulin: Gjennomsnittlig AUC Prografclamp var 2253 ± 2213 pmol*min/L. For Advagraf var den 2253 ± 1904 pmol*min/L.

C-peptid: Gjennomsnittlig AUC Prograf var 6007 ± 5216 pmol*min/L. For Advagraf var den 5828 ± 4515 pmol/L*min.

Resultater

Ratio Advagraf:Prograf insulin førstefase, ratiogjennomsnitt $1,21 \pm 0,65$ ($p=0,272$) for insulin og $1,08 \pm 0,424$ ($p=0,471$) for C-peptid. Dette var ikke-signifikante funn. Se figur 4.5 og appendix VI for individuelle verdier.



Figur 4-5 Individuelle verdier for AUC-første fasesekresjon (pmol/L*min), insulin til venstre og C-peptid til høyre. Gjennomsnitt er markert med lilla for insulin og grått for C-peptid.

Ratioen Advagraf:Prograf av produktet $AUC_{Insulin} * ISI$ ble analysert for å se om korrigering for eventuelle endringer i insulinsensitivitet hadde noen effekt. Gjennomsnittet $1,1 \pm 0,5589$ ($p=0,491$) var heller ikke statistisk signifikant (for individuelle verdier se appendix IV og V).

4.3 Farmakokinetikk

T_{max}.

Gjennomsnittlig t_{max} –Prograf: 1,79±1,07 timer

Gjennomsnittlig t_{max} Advagraf: 2,93±2,01 timer.

Det ble funnet en signifikant endring i t_{max} -verdier for de to formuleringene (p=0,032). For individuelle verdier se appendix.

C₀-troughkonsentrasjon.

For Prograf var gjennomsnittsverdien for C₀ 6,2 ± 1,9 og for Advagraf 5,3± 1,8, n= 13. C₀-data for pasient 6 ble ikke inkludert fordi vedkommende hadde endret dosering mellom de to clampdagene. Det ble funnet en statistisk signifikant gjennomsnittlig forskjell (C₀-Prograf - C₀Advagraf:) på 0,677± 1,10 ng/L (p=0,047).

Det ble ikke foretatt analyser av C12(24) målinger da det var et begrenset antall av pasientene som tok disse prøvene, og av disse tok noen prøver bare en av dagene.

Korrelasjonsanalyse C₀ mot korresponderende AUC_{Insulin 120-180} viste ikke-signifikant korrelasjon. Korrelasjonsverdiene var uansett også lave. For Advagraf var resultatet 0,141 (p=0.647) og for Prograf 0,358 (p=0,230). Korrelasjonsanalyser skulle vært foretatt mot AUC_{tacrolimus}, men pga for lite data ble ikke AUC beregnet.

5. Diskusjon

Denne studien har ikke vist signifikante endringer i parametre knyttet til første og andrefase insulinfrisetting etter skifte av tacrolimusformulering hos pasientgruppen som helhet, men individuelle forandringer var høyere enn forventet for enkeltpersoner i løpet av den korte tiden mellom de to undersøkelsene. C-peptiddataene viste samme tendenser.

For å oppnå statistisk styrke var det på forhånd bestemt å inkludere 20 pasienter til denne studien (kap.3.6). På grunn av tidsbegrensing ble 14 av disse inkludert i masteroppgaven. Studien vil bli ferdigstilt etter masteroppgavens utløp. I utgangspunktet var ikke 14 pasienter tilstrekkelig til å påvise endringer i henhold til endringer som var definert som klinisk signifikante.

Glukose clamp.

Andrefase insulinsekresjon.

Gjennomsnittlig forskjell i ratio Insulin AUC 120-180 var liten, og statistisk ikke signifikant. For pasient 1 var det data fra tid 80-140 som ble benyttet.

Førstefase insulinsekresjon viste ingen signifikante endringer.

Dataene viser stor intraindividuell variasjon. For tre av pasientene var det en ganske kraftig reduksjon av andrefase insulinfrisetting AUC for Advagrafclampen(4,7 og 9), for to av pasientene var det en kraftig økning i andrefase insulinfrisetting for den samme clampen (pas 2 og 13). For førstefasefrisetting var det også variasjon. To av pasientene (1 og 9) hadde markert nedgang i førstefase insulinsekresjon og to (6 og 10) hadde markant oppgang. Disse funnene kan gjenfinnes i C-peptidanalysene, men med mindre utslag. C-peptidkonsentrasjonene var høyere enn de sammenfallende konsentrasjonene for insulin, dette er i overenstemmelse med tidligere

Diskusjon

clampstudier[30] og skyldes bl. a. ulikheter i hepatisk clearance. Insulin:C-peptid ratioen ble ikke beregnet.

Første fase insulinsekresjon er av stor betydning for blodsukkerhomeostasen, tap av denne kan lede til hyperglykemi og hyperinsulinemi som igjen kan føre til utvikling av diabetes[64]. Det er derfor et mål på glykemisk status.

Det var stor variasjon mellom individer, men også for samme individ. Metoden har som forutsetning at målingene er reproducerbare, og at det ikke er naturlige svingninger i glukosehomeostasen som kan forårsake endringer i resultater.

Ved utarbeidelsen av clamp som metode ble det foretatt reclamping av 6 individer for å teste om det er signifikante intraindividuelle variasjoner. Ingen signifikante endringer i parametre ble observert. Metoden anses som høyst reproducerbar. [39].

Det er imidlertid stor normalvariasjon mellom individer. Rudenski et al viste en variasjon på individuelle responser med range en halv til to ganger median for førstefasesekresjon[30]. Det er i tillegg faktorer som påvirker glukosehomeostasen, både langtidseffekter og mer akutte. Det er et kjent fenomen at trening påvirker sukkeromsetningen. Plasmaglukose påvirkes av langvarig trening, glukoseopptak i muskler økes og insulinfrisetting nedsettes. Mekanismene involverer en rekke signaler[65]. O'Rahilly et al utførte i 1988 en sammenliknende studie på trente og utrente individer ved hjelp av hyperglykemisk clamp og viste at de godt trente individene hadde signifikant redusert første og andrefase C-peptidresponser ved fikserte glukosekonsentrasjoner. Dette kan ses etter en enkelt utmattende økt og effekten kan vare opptil 18 timer [59]. Kosthold påvirker også glukoseomsetningen. Det er vanlig å utføre prosedyren i et postabsorbtivt stadium, etter faste.

Vektbevarende diett bestående av minst 200-300 g karbohydrat ble i flere studier vektlagt i dagene før clamper ble gjennomført. Varighet av HCG varierer, fra 150 til 180 minutter er sett [38, 39, 59, 66]. En annen faktor som kan influere på insulinresponsen er insulinsensitivitet. Det vil være av betydning å vite om

Diskusjon

eventuelle endringer i insulinfrisetting skyldes endring i insulinsensitivitet eller redusert insulinsekresjon. En hyperglykemisk clamp kan benyttes til å evaluere både insulinfrisetting og insulinsensitivitet[39]. Mitrakou et al viste høy korrelasjon mellom glukose infundert i en euglykemisk clamp og glukose infundert siste timen i en hyperglykemisk clamp dividert med sammenfallende plasma insulinkonsentrasjon(M/I)(ISI). ISI-verdier fra hyperglykemisk clamp var i denne studien gjennomgående høyere enn de for en euglykemisk clamp, men korrelasjon var høy ($r=0,84$, $P<0,0001$)[27]. Det er likevel begrensinger ved bruk av HGC for å teste insulinsensitivitet. Fastende blodglukose må være under ønsket clamp-nivå, man må unngå glykosuri, i tillegg må individene som testes ha en viss grad av insulinsekresjon[38]. I vår studie var det ikke kontroll av kosthold, men pasientene ble oppfordret til å holde samme livsstil før hver clamp. Noen rapporterte imidlertid å ha trent hardt dagen før Advagraf-clamp (pasient 4 og 12).

En faktor som er av betydning for reproduserbarheten og sammenlikning av clamper er plasmaglukosenivået. Det er essensielt at plasmaglukosen ligger på omtrent samme gjennomsnittlige nivå uten for store variasjoner for at de skal kunne sammenliknes, både mellom individer og for forskjellige clamper på samme individ. Vi benyttet samme fremgangsmåte når det gjaldt bolusdose og startinfusjonshastighet. De ble begge beregnet ut i fra pasientvekt. Det viste seg at det i løpet av enkelte clamper ble vanskelig å opprettholde nivået av hyperglykemi, og snittet lå under 10 mmol/L. Det var enda tydeligere for den siste timen av clampen. Gjennomsnitt for prografclamp og advagrafclamp var ganske sammenfallende (se figur 4.1), men det var til dels store variasjoner for prografclamp og advagrafclamp for en del individer. Dette gjaldt spesielt pasient 4, 8, 10, og 12. Plasmaglukosenivået brukes for å beregne insulinsensitivites indeks (ISI, formel 3.7), som igjen er en faktor i beregningen av disposition indeks. I tillegg sammenliknes AUC som respons til plasmaglukosen. Når gjennomsnittlig plasmaglukosenivå ikke blir korrigert for blir forutsetningen for en direkte sammenlikning av $AUC_{120-180}$ dårligere. Primærmålet med denne studien var

Diskusjon

nettopp å undersøke andrefase insulinsekresjon som respons til et *fiksert* plasmaglukosenivå. Det bør derfor korrigere for plasmaglukose-konsentrasjon, slik at clamper for hvert individ kan sammenliknes på et bedre grunnlag.

Farmakokinetikk

Kinetikkdata som ble samlet inn var for begrenset til å gi fullverdige non-kompartiment AUC-profiler til korrelasjonsanalyser med effekt på insulinfrisetting.

Analyser av t_{\max} gav en signifikant forskjell, det var som forventet. For C_0 målinger for Prograf og Advagraf var det en signifikant forskjell mellom de to formuleringene.

Tidligere studier har vist at Advagraf ligger signifikant lavere i trough-målinger for *de novo* nyretransplanterte [55, 56]. For pasienter som konverteres fra Prograf til Advagraf med samme døgndoseratio, kan det ut i fra denne studien se ut som om AUC_{0-24} ligger noe lavere for Advagraf enn for Prograf. For trough-målinger var det en signifikant forskjell, Advagraf lå lavere enn Prograf. Dette kan ha en betydning for påvirkning av glukoseomsetning.

Benkali et al fant en stor PK-variabilitet for Advagraf i en studie av 45 stabile nyretransplanterte, t_{\max} varierte fra 40 minutter til 4 timer postdose, liknende våre funn, i tillegg var det stor variasjon i AUC fra pasient til pasient[67].

Det har tidligere vært spekulert i om tac-eksponering er β -celletoksisk i seg selv, eller om det er doseavhengig forhold [68].

Det har vært og er et mål å finne et terapeutisk vindu for tacrolimus som optimaliserer behandlingen, slik at god immunosuppressiv effekt opprettholdes, men bivirkninger

Diskusjon

reduseres. På Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet er nå mål for trough (C_o) på 3-5 $\mu\text{g/L}$ [6]. En review fra 2003[69] av store europeiske studier av tac viste at det tidligere var vanlig med konsentrasjoner på over 10 $\mu\text{g/L}$. Den samme studien foreslo et mulig dose-effekt forhold for utvikling av PTDM. Det er i nyere studier av Advagraf ikke rapportert om økende mengde eller alvorlighetsgrad av bivirkninger. Det er svært lav insidens av hyperglykemiske lidelser/diabetes i konversjonsgrupper av Advagraf[70]. Det er forventet og har sannsynligvis sammenheng med at PTDM vanligvis oppstår kort tid etter transplantasjon [69, 71] . Diabetes som oppstår utover dette kan komme av mekanismer som leder til Diabetes Mellitus type to i den generelle befolkningen heller enn en effekt av immunosuppressiv behandling[71].

Studien hadde en crossover design. Pasientene var ikke randomisert. Alle 14 pasienter startet på Prograf og byttet deretter til Advagraf. Dermed vil ikke en eventuell carry-over effektivt være mulig å oppdage i denne studien . Prograf og Advagraf er imidlertid samme legemiddel, og det er forskjell i kinetikkprofil som teoretisk sett skal kunne utgjøre en forskjell. Ut i fra dette pasientmaterialet virker det som om de individuelle variasjonene er store.

I denne studien har det ikke blitt vist noen statistisk signifikante endringer i andre fase insulinfrisetting eller andre parametre i glukosehomeostasen.

Veien videre.

For å få signifikante resultater bør pasienttallet økes. Studien har inkludert alle pasientene og vil fortsette til alle data er analysert.

6. Kildeliste

1. THorsby, E., *Norsk transplantasjonsmedisin gjennom 50 år*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2006. **126**(126): p. 3305-10.
2. *The Norwegian Renal Registry ANNUAL REPORT 2008*, T. Leivestad, Editor. 2008, Rikshospitalet, Oslo, Norway.
3. Leivestad, T., *Nyretransplantasjonsstatistikk*, K. Havnes, Editor. 2010.
4. *Norsk Nyremedisinsk Forening: ANNUAL REPORT 2008, The Norwegian Renal Registry*. 2008, Rikshospitalet.
5. Bogen, B. and L.A. Munthe, eds. *Immunologi*. 2 ed. 2007, Universitetsforlaget: Oslo.
6. *PROTOKOLL FOR NYRE-TRANSPLANTASJON OG PANCREAS-TRANSPLANTASJON*. 2010, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet.
7. Heldal, K., et al., *Clinical outcomes in elderly kidney transplant recipients are related to acute rejection episodes rather than pretransplant comorbidity*. Transplantation, 2009. **87**(7): p. 1045-51.
8. Nylenna, M. *Medisinsk ordbok*. 2010 [cited 2010 27.05]; Available from: http://ordnett.no/ordbok.html?search=compliance&search_type=&publications=17.
9. Jin, J., et al., *Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective*. Therapeutic and Clinical Risk Managements, 2008. **4**(1): p. 269-286.
10. Weng, F.L., et al., *Race and electronically measured adherence to immunosuppressive medications after deceased donor renal transplantation*. Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**(6): p. 1839-48.
11. European_medicines_agency, *Summary of product characteristic for ADVAGRAF*. 2007, European medicines agency.
12. De Geest, S., et al., *Incidence, determinants, and consequences of subclinical noncompliance with immunosuppressive therapy in renal transplant recipients*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 340-7.
13. Butler, J.A., et al., *Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review*. Transplantation, 2004. **77**(5): p. 769-76.
14. Morrissey, P.E., et al., *Factors contributing to acute rejection in renal transplantation: the role of noncompliance*. Transplantation Proceedings, 2005. **37**(5): p. 2044-7.
15. Ranta, F., et al., *Regulation of calcineurin activity in insulin-secreting cells: stimulation by Hsp90 during glucocorticoid-induced apoptosis*. Cellular Signalling, 2008. **20**(10): p. 1780-6.
16. Kung, L. and P.F. Halloran, *Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations*. Transplantation, 2000. **70**(2): p. 327-35.
17. Brunton, L.L., L.S. Goodman, and A. Gilman, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*.
18. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of Therapeutics*, L.L. Brunton, Editor. 2005.
19. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 5 ed. 2003, London: Churchill Livingstone.
20. *Felleskatalogen*. 2010 25. 05. 2010.
21. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale for Prograf (SPC) 2009*; 24.06.2009:[Available from:

- http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=915b4779-8d5a-4ea9-9586-2ff4fd60c6fb.
22. Staatz, C.E., et al., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation*. Clinical Pharmacokinetics, 2004. **43**(10): p. 623-53.
 23. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale for Advagraf (SPC)*. 2009; 25.03.09:[Available from:
http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=29ffe11-613c-432d-a309-28537d535ec4.
 24. Wallemacq, P., et al., *Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference*. Therapeutic Drug Monitoring, 2009. **31**(2): p. 139-52.
 25. Vicari-Christensen, M., et al., *Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence*. Progress in Transplantation, 2009. **19**(3): p. 277-84.
 26. Burk, O., et al., *Cytochrome P450 3A and their regulation*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2004. **369**(1): p. 105-24.
 27. Davis, S.N., *Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, L.L. Brunton, Editor. 2006, McGraw-Hill Medical publishing division. p. 1613-1648.
 28. Toft, I., et al., *Insulin kinetics, insulin action, and muscle morphology in lean or slightly overweight persons with impaired glucose tolerance*. Metabolism: Clinical & Experimental, 1998. **47**(7): p. 848-54.
 29. Rudenski, A.S., et al., *The beta cell glucose stimulus-response curve in normal humans assessed by insulin and C-peptide secretion rates*. Metabolism: Clinical & Experimental, 1988. **37**(6): p. 526-34.
 30. Redmond, J.B., et al., *Effects of Tacrolimus (FK506) on Human Insulin Gene Expression, Insulin mRNA Levels, and Insulin Secretion in HIT-T15 Cells*. J. Clin. Invest, 1996. **98**(12): p. 2786-2793.
 31. Johnson, J.D., et al., *Different effects of FK506, rapamycin, and mycophenolate mofetil on glucose-stimulated insulin release and apoptosis in human islets*. Cell Transplantation, 2009. **18**(8): p. 833-45.
 32. Heit, J.J., et al., *Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 345-9.
 33. Heit, J.J. and J.J. Heit, *Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics*. Bioessays, 2007. **29**(10): p. 1011-21.
 34. Drachenberg, C.B., et al., *Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation*. Transplantation, 1999. **68**(3): p. 396-402.
 35. Boots, J.M., et al., *Glucose metabolism in renal transplant recipients on tacrolimus: the effect of steroid withdrawal and tacrolimus trough level reduction*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(1): p. 221-7.
 36. Hoff, J.P.V., M.H.L. Christiaans, and E.M.v. Duijnhoven, *Evaluating mechanisms of post-transplant diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(6).
 37. Mitrakou, A., et al., *Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1992. **75**(2): p. 379-82.

38. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. American Journal of Physiology, 1979. **237**(3): p. E214-23.
39. *Norsk legemiddelhåndbok 2007*. 2010.
40. *Norsk legemiddelhåndbok* A. Vilberg, Editor. 2010.
41. Hjelmesaeth, J., et al., *Diagnosing PTDM*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1761.
42. Hjelmesaeth, J., et al., *Response to Montori et al. Post-transplantation diabetes (PTD), risk factors for its development, prognostic implications, and optimal management of the disease*. Diabetes Care, 2002. **25**(9): p. 1667; discussion 1667-8.
43. Hjelmesaeth, J. *F5 Diabetes mellitus etter transplantasjon*. Veileder i nefrologi 2005 24.02.05 [cited 2010 16.04.10]; Available from: <http://legeforeningen.no/id/66768>.
44. Montori, V.M., et al., *Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 583-92.
45. Valderhaug, T.G., et al., *Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade*. Transplantation, 2007. **84**(9): p. 1125-30.
46. Hjelmesaeth, J., et al., *The impact of impaired insulin release and insulin resistance on glucose intolerance after renal transplantation*. Clinical Transplantation, 2002. **16**(6): p. 389-96.
47. Hjelmesaeth, J., et al., *Tapering off prednisolone and cyclosporin the first year after renal transplantation: the effect on glucose tolerance*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2001. **16**(4): p. 829-35.
48. Midtvedt, K., et al., *Insulin resistance after renal transplantation: the effect of steroid dose reduction and withdrawal*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**(12): p. 3233-9.
49. Schiel, R., et al., *Post-transplant diabetes mellitus: risk factors, frequency of transplant rejections, and long-term prognosis*. Clinical & Experimental Nephrology, 2005. **9**(2): p. 164-9.
50. Pratley, R.E. and C. Weyer, *The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus*. Diabetologia, 2001. **44**(8): p. 929-45.
51. Cosio, F.G., et al., *New onset hyperglycemia and diabetes are associated with increased cardiovascular risk after kidney transplantation*. Kidney International, 2005. **67**(6): p. 2415-21.
52. Alloway, R., et al., *Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen*. Transplantation Proceedings, 2005. **37**(2): p. 867-70.
53. Florman, S., et al., *Conversion of stable liver transplant recipients from a twice-daily Prograf-based regimen to a once-daily modified release tacrolimus-based regimen*. Transplantation Proceedings, 2005. **37**(2): p. 1211-3.
54. Crespo, M., et al., *De novo kidney transplant recipients need higher doses of Advagraf compared with Prograf to get therapeutic levels*. Transplantation Proceedings, 2009. **41**(6): p. 2115-7.
55. Wlodarczyk, Z., et al., *Pharmacokinetics for once- versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo kidney transplantation: a randomized, open-label trial*. American Journal of Transplantation, 2009. **9**(11): p. 2505-13.
56. First, M.R. and M.R. First, *First clinical experience with the new once-daily formulation of tacrolimus*. Therapeutic Drug Monitoring, 2008. **30**(2): p. 159-66.

57. Caumo, A., et al., *First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function*. American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism, 2004. **287**(3): p. E371-85.
58. O'Rahilly, S.O., et al., *The glucose stimulus-response curve of the beta-cell in physically trained humans, assessed by hyperglycemic clamps*. Metabolism: Clinical & Experimental, 1988. **37**(10): p. 919-23.
59. Hume, R., *Prediction of lean body mass from height and weight*. Journal of Clinical Pathology, 1966. **19**(4): p. 389-91.
60. Wallemacq, P., et al., *Multi-site analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT tacrolimus assay*. Therapeutic Drug Monitoring, 2009. **31**(2): p. 198-204.
61. *Human Insulin ELISA kit Catalog # KAQ1251*. [Instruction manual] 2009 [cited 2010 12.05]; Available from:
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KAQ1251_Rev2.1.pdf.
62. *C-Peptide ELISA Kit Code K6220*. [cited 2010 13.05.10]; Available from:
http://www.dako.no/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=109467002.
63. Del Prato, S., *Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia*. Diabetologia, 2003. **46 Suppl 1**: p. M2-8.
64. Widmeier, E.P., H. Raff, and K.T. Strang, *Vander's Human Physiology. The mechanisms of body function*. 10 ed. 2006, New York: McGrawHill Higher Education.
65. Korytkowski, M.T., S.L. Berga, and M.J. Horwitz, *Comparison of the minimal model and the hyperglycemic clamp for measuring insulin sensitivity and acute insulin response to glucose*. Metabolism: Clinical & Experimental, 1995. **44**(9): p. 1121-5.
66. Benkali, K., et al., *Advagraf Pharmacokinetics Analysis in Stable Renal Transplant Patients*, in *American Transplant Congress*. 2009: Boston. MA. USA.
67. David-Neto, E., et al., *The dynamics of glucose metabolism under calcineurin inhibitors in the first year after renal transplantation in nonobese patients*. Transplantation, 2007. **84**(1): p. 50-5.
68. Pascual, J., et al., *A low incidence of new-onset insulin-dependent diabetes mellitus using tacrolimus in kidney recipients in Europe*. Transplantation Proceedings, 2003. **35**(5): p. 1760-1.
69. Alloway, R., J.P. Van Hooff, and P. Trunecka, *Tacrolimus once-daily prolonged release (Advagraf) in kidney, liver and heart recipients: 4 year results.*, in *American transplant congress*. 2009: Boston, MA, USA.
70. van Hooff, J.P., et al., *Evaluating mechanisms of post-transplant diabetes mellitus*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2004. **19 Suppl 6**: p. vi8-vi12.

APPENDIX

6.1 Appendix I Studieprotokoll

Effects on insulin secretion and sensitivity of two different formulations tacrolimus

—

Prograf[®] and Advagraf[®]

Responsible investigator:

Karsten Midtvedt, MD, Ph.D, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet.

Co-investigators:

Kjerstin Havnes, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Stein Bergan, Professor, Ph.D., Department of Medical Biochemistry, Rikshospitalet.

Trond Jenssen, Professor MD, Ph.D, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet.

Anders Hartmann, Professor MD, Ph.D, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet.

Anders Åsberg, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

APPENDIX

Background

Calcineurin inhibitors, such as tacrolimus (Tac) and cyclosporine (CsA), are essential in the immunosuppressive therapy of solid organ transplant recipients. Both Tac and CsA are effective immunosuppressive drugs but they have different side-effect profiles [72-75]. Tac is especially prone to induce post transplant diabetes mellitus (PTDM) [74], most probably via a negative effect on pancreatic beta-cell function [76, 77].

Recently a new slow release formulation of Tac (Advagraf[®]) was released on the European market allowing once daily administration to replace the twice daily dosing of the old formulation of Tac (Prograf[®]). The conversion from twice to once daily administration is to be done in a 1:1 daily dose ratio and it is supposed to be possible to use the same therapeutic drug monitoring (TDM) strategy, including the same trough concentration targets, with the new once daily formulation [78]. However, the effect of the new formulation on the glucose metabolism has not been investigated with appropriate methods. The efficacy trials performed have not found any significant difference in PTDM incidence between the two Tac formulations, but some suggest a disadvantage with Advagraf[®] [79].

Rationale for the study

Tac is especially prone to negatively influence glucose metabolism in renal transplant recipients. No studies have so far been performed to investigate the effect on insulin secretion and/or insulin sensitivity of the two different formulations of Tac. It is possible that the difference in pharmacokinetic profile between the two formulations will affect pancreatic beta-cell function differently.

APPENDIX

Ethical considerations

There are no major ethical considerations with an investigation like this since we only will obtain serial blood samples from an intravenous canulla (venflon), which is a safe procedure used in general clinical practice. During the clamp investigation we collect less than 2 dL of blood, which is considered not to be of clinical significance in these patients. The investigations will be performed at Rikshospitalet, and the patients will stay in a comfortable room during the 4 to 5 hours investigations.

Since there is a lack of detailed information about the effect of the new Tac formulation on an important cardiovascular risk factor as PTDM and the use of this formulation most probably will increase, there is a rationale for this kind of study in the relevant patients. Following inclusion in the study, individual patients may benefit from a closer follow-up and optimalization of the drug treatment.

Study objectives

The primary objective is to compare insulin secretion ($\text{Secr}_{2,\text{phase}}$) between the two different formulations of Tac.

Secondary objectives are to compare the effect of the two formulations on $\text{Secr}_{1,\text{phase}}$, insulin sensitivity and to investigate possible associations with individual systemic tacrolimus exposures.

Study design

Twenty adult kidney transplanted patients treated with Prograf[®] twice daily or Advagraf[®] once daily will be included in the study. Eligible patients may be included in a stable posttransplant phase (no Tac dose adjustments or acute rejection episodes

APPENDIX

the preceding 2 weeks). A 3-hour hyperglycaemic clamp will be performed while patients are treated with their standard Tac formulation and repeated 4-6 weeks after switching to the alternative Tac formulation. The clamp investigation will be done after administration of the morning dose of Tac. Samples for measurement of Tac whole blood concentrations will be drawn for all patients up to 24 hours after morning Tac dosing. It is not mandatory for all patients to perform full 24 hour pharmacokinetic investigations.

Switching to the alternative Tac formulation will be performed in a 1:1 daily dose ratio and subsequently adjusted according to centre protocol for trough concentrations (5-10 ng/mL). Patients will meet for trough concentration measurements at Rikshospitalet for appropriate dose adjustment in the period between the two investigations days.

Patients

The patients will primarily be recruited from the great-Oslo area and all study visits will be performed at Rikshospitalet. Patients will otherwise follow standard post transplant procedures at their local hospital during the study period. Patients included in other clinical trials are also eligible for inclusion in the present study as long as they are not treated with investigational drugs.

Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and ICH-GCP guidelines. Patients and investigator will sign the patient information which will be kept on file. The patient will receive a copy of the patient information. Patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

APPENDIX

Inclusion criteria

Renal transplant recipients on stable Tac based immunosuppressive therapy.

18 years of age or older.

Stable prednisolone dose of 5 mg/day or less.

S-creatinine below 150 $\mu\text{mol/L}$

Signed informed consent.

Exclusion criteria

Acute rejection episodes within the last 2 weeks prior to inclusion.

Changes in Tac dosing within the last 2 weeks prior to inclusion.

Diabetes mellitus (WHO criteria).

Pregnant or nursing mothers or women of childbearing potential without acceptable contraception strategy.

Concomitant treatment with: diltiazem, verapamil, fenytoin, carbamazepin, fluconazole, ketoconazole, voriconazole, erythromycin, clarithromycin.

Patients treated with investigational drugs.

Study procedures

Hyperglycemic glucose clamp:

APPENDIX

The patients meet in the morning after an overnight fast, and are administered their morning dose of Tac (Prograf[®] or Advagraf[®]). Patients are then set up for the clamp procedure and administered an intravenous bolus dose of 0.2 g dextrose per kg body weight, followed by a continuous infusion of glucose to clamp the blood glucose concentration at 10 mmol/L over the entire investigation (180 minutes). The glucose infusion will be administered via an intravenous cannula (venflon) in one arm while the blood samples will be drawn in the other arm where the blood will be arterialized by heating the forearm (to 52 °C) by using a heating cuff. Blood glucose will be measured every 5-10. minutes during the clamp procedure. Blood samples for measurement of serum insulin and C-peptide concentrations will be drawn at; -15 min, and at 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 minutes after administration of the dextrose bolus dose.

Blood samples:

Blood samples (3 ml EDTA vacutainer tubes) for determination of whole-blood Tac concentration will be drawn at time points indicated below. Patients are to be followed for 24 hours, but if this is not possible for some patients samples must be drawn for at least 4 hours.

The first sample is drawn before the administration of the morning dose (0 hours) and then at: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 23 and 24 hours following administration. When sampling on Prograf[®] the evening dose is given after the 12 hour sample and in these occasions additional samples at 12.5, 13, 13.5, 14 and 15 hours are to be drawn.

Whole-blood (5 ml EDTA) will be drawn once during the study for determination of *CYP3A* and *ABC*-transporter genotyping

APPENDIX

Clinical information:

Demographic data of the included patients will be registered in CRF's; age, height, weight, concomitant drugs and other potential cofactors that might affect the results.

Any adverse events will also be recorded in the CRF and reported in according to guidelines. SUSARs will be reported in paper form on standard CIOMS-forms.

Meals:

Patients meet fasting from 24:00 the evening before. A standard hospital breakfast can be consumed after the clamp investigation, with no further food restrictions.

Laboratory methods:

Plasma glucose will be analyzed in fresh whole blood using a plasma calibrated Hemocue201TM Analyser (Ängelholm, Sweden).

Serum insulin and C-peptide will be analyzed with ELISA kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using a micro plate reader (Wallac 1420 Victor 3TM Multilabel counter, PerkinElmer, Boston, MA, USA).

Whole-blood samples will be analyzed for Tac at the Department of Medical Biochemistry, Rikshospitalet.

CYP3A and *ABC*-transporter genotyping will be performed at the School of Pharmacy with by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism assays using specific primers and restriction enzymes followed by separation on 3% agarose gels [80-82].

APPENDIX

Withdrawals:

Patients are free to express the wish to withdraw at any time. Premature discontinuation of treatment will significantly lower the power of the study and therefore each withdrawn patient will be substituted. Premature discontinuation will be performed in patients whom develop new onset diabetes mellitus or other adverse events that, for intensity or nature, make the patient medically unfit to continue on treatment or who in the view of the attending physician may jeopardize the patient's condition.

Information to study personnel

All involved study personnel will receive the full study protocol and in addition they will be informed on a start-up meeting about the study procedures. Any changes during the study will be distributed by the principal investigator via e-mail to all involved study personnel.

Glucose clamp calculations

Lean body mass (lbm) is estimated using Hume's formula [83] which correlates well with tritiated water or electrical bioimpedance measures [84]. $\text{Secr}_{1,\text{phase}}$ is calculated as the area under serum insulin vs. time curve (AUC, trapezoidal rule) during the first 10 min of the clamp procedure, and $\text{Secr}_{2,\text{phase}}$ is calculated as the insulin AUC during the last hour (120–180 min) of the clamp procedure. The same calculations were also performed for C-peptide concentrations. Glucose disposal rate (GDR) is calculated from the amount of glucose infused during the last hour of the clamp. The IS index (ISI) is calculated as $\text{GDR} [\text{mmol/kg (lbm)*min}]$ divided by mean serum insulin

APPENDIX

(pmol/l) in the same period. Glucose clearance is calculated as ISI divided by mean serum glucose during the last 60 min of the clamp [85].

Pharmacokinetic calculations

Nonlinear mixed effects modeling (NONMEM software version VI and Intel Fortran (version 8) compilation tool) will be used to analyze the dose-concentration-time data for Tac using a population approach. The pharmacokinetic profile data will be used to develop a pharmacokinetics model including the effect of major covariates (e.g. age, gender, body size, renal function, hematocrit, acute rejection status etc.) on CL/F and V/F from the 24-hour pharmacokinetics investigations. If applicable additional trough concentration data from the routine follow-up of the patients in the study will be used to develop the model.

Exclusion of patient data will only be allowed if Tac concentrations have not been able to be measured accurately or in case of unavailable information that may interfere with pharmacokinetic evaluation, e.g. exact blood sampling time or dose given.

The POSTHOC, MAXEVAL=0 option in NONMEM will be used to estimate individual AUC_{0-24} and half-lives for each individual. Actually measured C_{trough} , C_{max} and T_{max} values will also be used to describe the pharmacokinetic properties of the patients.

Statistical considerations

Sample size:

APPENDIX

Based on the assumption that a 15% relative change in insulin secretion between the two formulations are clinically relevant and a relative standard deviation of 25% 20 patients are needed to assure a power of 80% at a 5% significance level. Patients that drop-out during the study will be substituted.

Analysis plan:

The primary end-point will be analyzed per-protocol by comparing the ratio of insulin sensitivity ($\text{Secr}_{2,\text{phase}}$) for the two formulations. Data will be transformed to obtain normal distribution if appropriate.

Secondary endpoints will be analyzed as follows:

Insulin $\text{Secr}_{1,\text{phase}}$

Insulin sensitivity index (ISI)

Association between insulin $\text{Secr}_{2,\text{phase}}$, $\text{Secr}_{1,\text{phase}}$ and ISI and systemic exposure of Tac (derived from individual NONMEM estimations)

All analysis above also performed for C-peptide

Study drug

The Advagraf[®] used in the study will be labelled with the following information:

APPENDIX

Til klinisk utprøving

ADVA-09 study

Hovedutprøver: Overlege Karsten Midtvedt, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00

Pasient nr:

Pasient initialer:

Dato utlevert:

Advagraf[®] (tacrolimus) xx mg tabletter

1 tablett hver morgen.

Oppbevares utilgjengelig for barn

APPENDIX

Commercially available drugs will be used as *study drug* and the handling of drugs will be performed in cooperation with the Pharmacy at Rikshospitalet.

Study duration

Each transplanted patient will be followed for a period of up to 6 weeks.

First patient in: Q3 2009.

Anticipated recruitment time: 9 months.

Insurance

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.

References

1. Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JJ, Christiaans MH, Vos PF, Blom HJ, Sweep FC, Demacker PN, Hilbrands LB. Improved cardiovascular risk profile and renal function in renal transplant patients after randomized conversion from cyclosporine to tacrolimus. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1880-8.
2. Knoll GA, Bell RC. Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 1999; 318: 1104-7.

APPENDIX

3. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, Uchida K, Pescovitz MD, Marchetti P, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Chadban S, El-Shahawy M, Budde K, Goto N. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant*. 2007; 7: 1506-14.
4. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation*. 2002; 73: 775-82.
5. Boots JM, van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Wolffenbuttel BH, van Hooff JP. Glucose metabolism in renal transplant recipients on tacrolimus: the effect of steroid withdrawal and tacrolimus trough level reduction. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 221-7.
6. van Duijnhoven EM, Boots JM, Christiaans MH, Wolffenbuttel BH, Van Hooff JP. Influence of tacrolimus on glucose metabolism before and after renal transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 583-8.
7. Alloway R, Steinberg S, Khalil K, Gourishankar S, Miller J, Norman D, Hariharan S, Pirsch J, Matas A, Zaltzman J, Wisemandle K, Fitzsimmons W, First MR. Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc*. 2005; 37: 867-70.
8. Silva HT, Jr., Yang HC, Abouljoud M, Kuo PC, Wisemandle K, Bhattacharya P, Dhadda S, Holman J, Fitzsimmons W, First MR. One-year results with extended-release tacrolimus/MMF, tacrolimus/MMF and cyclosporine/MMF in de novo kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007; 7: 595-608.

APPENDIX

9. Katz DA, Grimm DR, Cassar SC, Gentile MC, Ye X, Rieser MJ, Gordon EF, Polzin JE, Gustavson LE, Driscoll RM, O'Dea R F, Williams LA, Bukofzer S. CYP3A5 genotype has a dose-dependent effect on ABT-773 plasma levels. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 516-28.
10. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem.* 2002; 48: 1668-71.
11. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 297: 1137-43.
12. Hume R. Prediction of lean body mass from height and weight. *J Clin Pathol.* 1966; 19: 389-91.
13. Natali A, Toschi E, Camastra S, Gastaldelli A, Groop L, Ferrannini E. Determinants of postabsorptive endogenous glucose output in non-diabetic subjects. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetologia.* 2000; 43: 1266-72.
14. Mitrakou A, Vuorinen-Markkola H, Raptis G, Toft I, Mokan M, Strumph P, Pimenta W, Veneman T, Jenssen T, Bolli G, et al. Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75: 379-82.

6.2 Appendix II

Pasientinformasjon

Forespørsel om deltakelse i legemiddelutprøving

”Effekten av to ulike formuleringer av takrolimus på insulin sekresjon og følsomhet – Prograf[®] og Advagraf[®]”

Bakgrunn og hensikt

Dette er en forespørsel til deg om å delta i et forskningsprosjekt som innebærer å undersøke effekten på sukkeromsetningen av to ulike formuleringer av legemiddelet takrolimus: Prograf[®] som tas 2 ganger per dag og Advagraf[®] som tas 1 gang per dag. Etter din transplantasjon bruker du det immundempende legemidlet takrolimus (Prograf[®] eller Advagraf[®]). Takrolimus er et effektivt immundempende legemiddel men har en del bivirkninger, blant annet utvikler en del pasienter som bruker takrolimus diabetes. Formålet med denne studien er å undersøke i detalj både insulinfrigjøring og –følsomhet (blodsukkeromsetningen) for å se om det er noen forskjell mellom de to ulike formuleringene av takrolimus. Studien er en nasjonal studie som leger ved Rikshospitalet har tatt initiativ til, i samarbeid med forskere ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

Hva innebærer studien?

I løpet av studien vil det bli utført 2 undersøkelser av blodsukkeromsetningen din. Disse dagene må du møte fastende (uten mat, drikke eller medikamenter). Den første

APPENDIX

undersøkelsen utføres på den formuleringen av takrolimus som du bruker per i dag (Prograf[®] eller Advagraf[®]). Etter denne undersøkelsen skal du bytte til den alternative formuleringen og blodsukkeromsetningsundersøkelsen repeteres etter 4 til 6 uker. Undersøkelsene vil være hele dagen og med et besøk også morgenen etter. Det vil bli tatt mange blodprøver av deg, men du får innlagt en venflon slik at du slipper å bli stukket hver gang det tas blodprøver. Du vil få glukose rett inn i en blodåre via en venflon i den ene armen under hele undersøkelsen, og armen som vi tar blodprøver i vil bli lagt i en varmemansjett (52 °C). Etter at undersøkelsen er avsluttet vil du få frokost. I prøvene som tas under blodsukkeromsetningsundersøkelsene, vil også mengde takrolimus bli målt og vi vil også gjøre genundersøkelser med tanke på faktorer som kan påvirke takrolimusomsetning i kroppen. I de samme blodprøvene kan det senere bli aktuelt å utføre flere analyser som har med sukkeromsetningen eller andre prosesser i kroppen å gjøre; det kan gjelde tilstand etter transplantasjon, risiko for avstøtning, omsetning og utskillelse av legemidler osv.

Det er lagt opp til undersøkelser hele dagen, men etter de 4 første timene vil det gå to timer mellom hver prøvetaking, så da vil du ha uforstyrrede perioder mellom prøvetakingene. Hvis det skulle være vanskelig for deg å være tilstede hele dagen eller møte igjen dagen etter, kan dette intervallet kortes inn etter avtale. Årsaken til at vi helst ønsker undersøkelser hele dagen og noen få prøver morgenen etter, er at det vil gi oss mye nyttig tilleggsinformasjon, spesielt om Advagraf[®].

Etter at du har byttet til annen formulering av takrolimus, må du komme på noen ekstra kontroller på sykehuset for å ta blodprøver slik at legen kan stille inn riktig dose av den andre formuleringen. Når du er ferdig med studien, vil du i samråd med din lege bestemme hvilken av de to formuleringene av takrolimus du skal/ønsker fortsette med.

Hvis du er kvinne i fertil alder må du bruke prevensjon under hele studietiden.

APPENDIX

Totalt vil 20 pasienter delta i studien.

Mulige fordeler, ulemper og alvorlige bivirkninger

Fordelen med å bli med i denne studien er at påvirkningen på din sukkeromsetning vil bli undersøkt meget grundig. Videre vil du bidra til at vi får mer detaljert informasjon om hvordan den nye formuleringen av takrolimus påvirker sukkeromsetningen, noe som vil gjøre det lettere for oss å gi transplanterte pasienter (deg inkludert) den optimale behandling i fremtiden.

Ulempen med å bli med er at du må komme på to lange undersøkelser og noen korte poliklinikkbesøk for innstilling av alternativ takrolimus formulering. Det vil også tas ekstra blodprøver men ikke i et omfang som vil medføre noen negative effekter på deg, annet enn at du vil bli stukket noen ganger. Undersøkelsene vi skal utføre i denne studien er velkjente og har vært brukt mange ganger før på transplanterte pasienter uten noen problemer, så vi anser ikke at det er noen spesiell risiko forbundet med denne studien.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Listen som kan koble ditt navn til koden vil kun bli oppbevart på legesenteret/sykehuset og bare personell med ansvar for studien har tilgang til denne.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke deg fra studien uten at det får konsekvenser for din videre behandling. Du undertegner samtykkeerklæringen dersom du ønsker å delta.

APPENDIX

Har du spørsmål til studien, ta kontakt med overlege Karsten Midtvedt, 23 07 00 00/23 07 18 94.

Ytterligere informasjon om biobank, personvern, økonomi og forsikring finnes i kapittel B – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.

Samtykkeerklæring følger etter kapittel B. – *Signeres av den som samtykker til å delta i studien. Personen, som har informert om studien, kan bekrefte at informasjonen er gitt.*

Kapittel B - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Opplysninger som registreres om deg er informasjon om din transplantasjon og din helse etter transplantasjonen. Alle data innhentet under studien vil også bli registrert.

Representanter fra Statens legemiddelverk og kontrollmyndigheter i inn- og utland kan få utlevert studieopplysninger og gis innsyn i relevante deler av din journal.

Formålet er å kontrollere at studieopplysningene stemmer overens med tilsvarende opplysninger i din journal. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt.

Forskningsbiobank

Blodprøvene som blir tatt og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank. Prøver og resultater blir lagret i forskningsbiobanken som overlege Karsten Midtvedt, Medisinsk avdeling, Oslo universitetssykehus,

APPENDIX

Rikshospitalet (23 07 18 94) er ansvarlig for. De oppbevares til 2026 før de blir destruert og slettet.

Innsynsrett og oppbevaring av materiale

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, vil det ikke samles inn flere opplysninger eller mer materiale. Opplysninger som allerede er innsamlet fra deg vil ikke bli slettet.

Finansiering

Studien og biobanken er finansiert av interne driftsmidler ved Rikshospitalet og Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Forsikring

Du er forsikret i henhold til Lov om produktansvar i Legemiddelforsikringen.

Informasjon om utfallet av studien

Etter at studien er blitt gjort opp kan du få informasjon om resultatene fra studien ved å henvende deg til overlege Karsten Midtvedt, 23 07 00 00/23 07 18 94.

Samtykke for deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Bekreftelse på at informasjon er gitt deltakeren i studien

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

6.3 Appendix III

Clamp/kinetikkskjema

PRØVEOVERSIKT VED GLUKOSE-CLAMP I ADVAGRAF/PROGRAF-STUDIEN.

NAVN: _____ Nr: _____ DATO: _____ ADVAGRAF/PROGRAF

Mobilnr: _____

Prøve Tidspkt.	Glukose Kons.	Glukose inf.h.ml/t	Ml. Infund.	Insulin C-pep.	Prograf	Advagraf	Klokke slett:
÷15min							
0							
Dose:							
2,5							
5							
7,5							
10							
15							
20							
25							
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							
70							
75							
80							
85							
90							
95							
100							
105							
110							
115							
120							
125							
130							
135							
140							
145							
150							
155							
160							
165							
170							
175							
180							
4 timer							
6							
8							
10							
12							
Dose:							
12,5							
13							
13,5							
14							
15							
23							
24							

Pasientinfo:

HØYDE: _____

VEKT: _____

BOLUS-DOSE:

$(150\text{mg/kg} \times \text{.....kg}) / 200\text{mg/ml} = \text{.....ml}$

20 ml NaCL

START INFUSJONSHASTIGHET:

$(0,3 \times \text{.....kg}) \times 3 = \text{.....ml/time}$

DOSER: _____

Morgen:

PROGRAF mg. kl.

Kveld:

PROGRAF mg. kl.

ADVAGRAF mg. kl.

0-prøve: _____

TX-prøver, CYP 3A, Genotyping.

Hendelser:

Sign:

APPENDIX

6.4 Appendix IV

Individuelle verdier GDR, ISI, Clearance, DI

PASIENT	GDR		ISI		Clearance		DI	
	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf
Pasient 1	89	85,9	0,159	0,164	0,0161	0,0165	5824	5667
Pasient 2	67	45,2	0,419	0,268	0,0476	0,0268	1692	2125
Pasient 3	60,4	41,5	0,159	0,101	0,0166	0,0103	3433	2688
Pasient 4	62,2	46,1	0,250	0,266	0,0271	0,0263	3673	1792
Pasient 5	29,9	46,1	0,043	0,070	0,0043	0,0074	1499	2258
Pasient 6	47,9	34,8	0,230	0,122	0,0230	0,0125	2927	1778
Pasient 7	48,7	45,6	0,375	0,517	0,0384	0,0550	2169	1773
Pasient 8	78,5	76,7	0,355	0,372	0,0357	0,0399	4758	4969
Pasient 9	43,7	44,6	0,197	0,328	0,0201	0,0347	2123	1933
Pasient 10	53	74,9	0,079	0,125	0,0079	0,0142	2861	3940
Pasient 11	27	36,6	0,115	0,137	0,0121	0,0138	1058	1479
Pasient 12	78,4	119	2,460	2,020	0,2757	0,2715	4926	8744
Pasient 13	52,6	73,2	0,496	0,505	0,0483	0,0491	1642	3023
Pasient 14	45,3	61,7	0,396	0,416	0,0415	0,0418	2943	4136

6.5 Appendix V

AUC første og andrefase insulinsekresjon, pasientvis.

Pasient nummer	Førstefase insulinsekresjon AUC t=0-10 pmol/l*min		Ratio A/P	Andrefase insulinsekresjon AUC=120-180 pmol/l*min		Ratio A/P
	Prograf	Advagraf		Prograf	Advagraf	
Pas 1	8567	5482	0,64	36715	34584	0,94
Pas 2	758	1307	1,72	4043	7934	1,96
Pas 3	3588	2642	0,74	21595	26741	1,24
Pas 4	1357	696	0,51	14709	6734	0,46
Pas 5	2120	2080	0,98	34506	32174	0,93
Pas 6	1734	3948	2,28	12704	14545	1,14
Pas 7	2325	2618	1,13	5780	3427	0,59
Pas 8	1625	1460	0,90	13385	13356	1,00
Pas 9	405	944	2,33	10781	5900	0,55
Pas 10	4561	6528	1,43	36299	31471	0,87
Pas 11	1328	845	0,64	9163	10787	1,18
Pas 12 *						
Pas 13	493	908	1,84	3312	5991	1,81
Pas 14	1366	765	0,56	7433	9937	1,34

* Pasient 12: Pga analysefeil må insulinprøvene reanalyseres.

6.6 Appendix VI

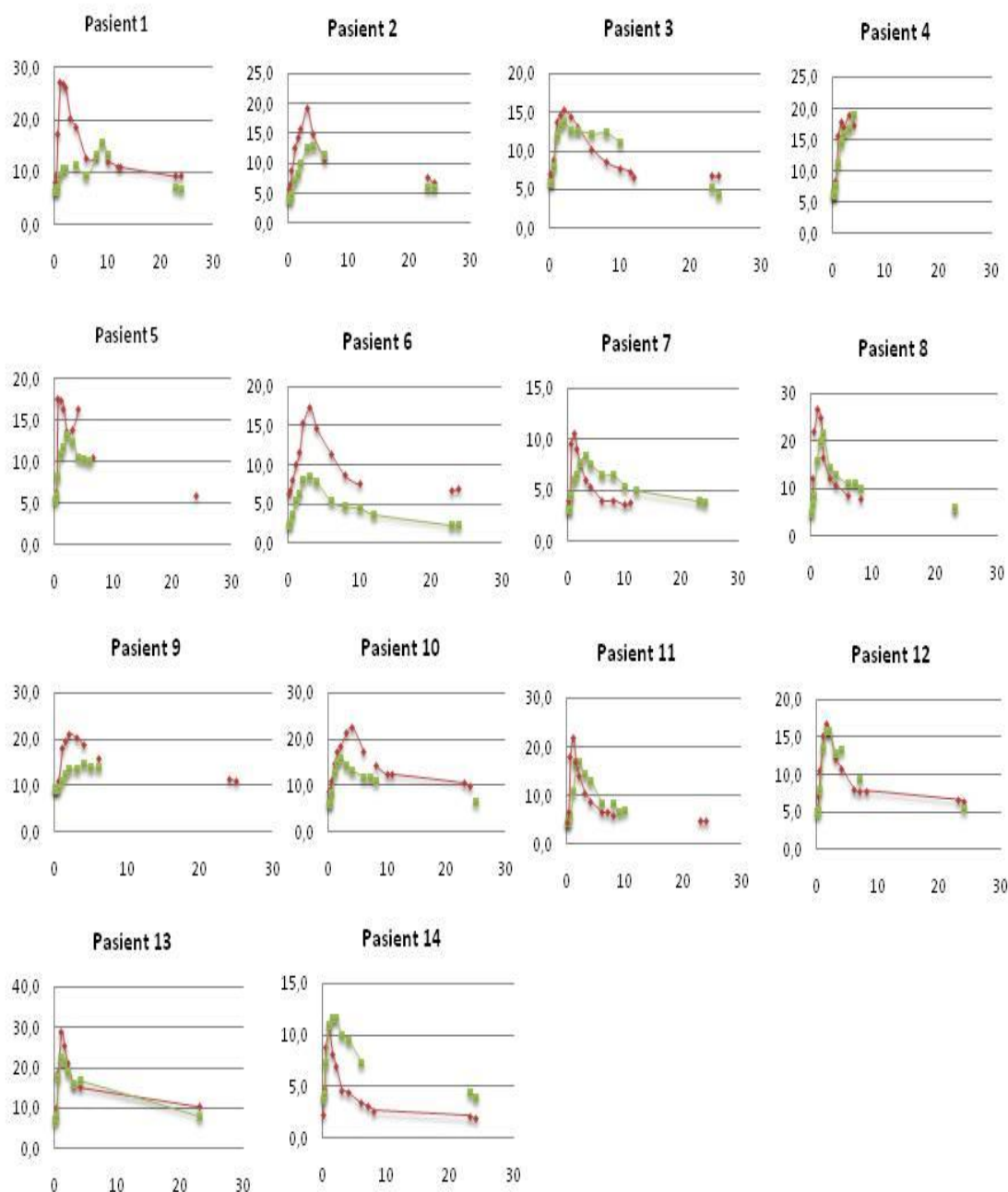
AUC første og andrefase C-peptidsekresjon.

Pasient- nummer	Førstefase C- peptidsekresjon AUC t=0-10 pmol/l*min			Andrefase C- peptidsekresjon AUC t=120-180 pmol/l*min		
	Prograf	Advagraf	Ratio A/P	Prograf	Advagraf	Ratio A/P
Pas 1 *	21234	18277	0,86	237922	226893	0,95
Pas 2	7929	8440	1,06	151714	202626	1,34
Pas 3	8779	6423	0,73	193715	208751	1,08
Pas 4	2780	2299	0,83	83290	67883	0,82
Pas 5	4543	3638	0,80	96351	98031	1,02
Pas 6	4829	8091	1,68	117739	109853	0,93
Pas 7	11032	10658	0,97	110323	99961	0,91
Pas 8	5388	3118	0,58	178211	178054	1,00
Pas 9	1808	3334	1,84	103579	98562	0,95
Pas 10	6104	6940	1,14	127058	130502	1,03
Pas 11	2061	2539	1,23	124256	128576	1,03
Pas 12	2423	2080	0,86	73234	92528	1,26
Pas 13	1704	2966	1,74	38850	66783	1,72
Pas 14	3477	2784	0,80	140455	162726	1,16

* For pasient 1 er tidsintervallet for andrefasesekresjon t=80-140.

6.7 Appendix VII

AUC kurver pasientvis.



Pasientvis sammenlikning av AUC-kurver pasientvis. Prograf er i rødt, Advagraf i grønt.. Y-aksen har benevning $\mu\text{g/L}$, X-aksen har benevning timer.

6.8 Appendix VIII

Kinetikkdata pasientvis

Målte farmakokinetiske parametre									
	Dosering	C0-måling (µg/L)		Cmax (µg/L)		Tmax (timer)		C12/24	
Pasient	mg/kg/døgn	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf
1	0,07	8	6,4	27,2	15,6	1	9	9,3	6,8
2	0,06	5,6	4,2	19,3	12,9	3	4	6,8	6,0
3	0,05	7	5,9	15,3	13,9	2	2	6,8	4,4
4	0,03	6	6,6	19,1	18,9	3	4	X	x
5	0,06	5,8	5,3	17,7	13,2	0,5	2	6	x
6	0,031***	6,4	2,4	17,4	8,6	3	3	7	2,3
7	0,27	4,1	3,1	10,6	8,4	1	3	X	3,9
8	0,08	5,6	5,1	26,9	21,9	1	2	5,6 *	x
9	0,02	9,1	9,5	21,3	14,8	2	4	11,5	x
10	0,04	9	6,2	22,8	16,1	4	2	10,1	6,7 **
11	0,04	4,6	4,4	22	16,9	1	1,5	4,7	x
12	0,05	5,5	4,7	16,9	16	1,5	2	6,5	5,5
13	0,11	8,1	6,7	29,2	22,5	1	1	10,5 *	8,2 *
14	0,05	2,3	3,8	10,8	11,7	1	1,45	2	4,0
X = prøve ikke tatt * = tatt ved 23 timer ** = tatt ved 25 timer *** for Advagraf = 0,02									